

Taciane Stein da Silva Leal

**O NÚCLEO TUBEROMAMILAR MODULA A
NOCICEPÇÃO E A INFLAMAÇÃO PERIFÉRICA VIA
RECEPTOR H1 MEDULAR.**

Tese submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia
do Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito à obtenção
do Título de Doutor em
Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos
Rogério Tonussi

Florianópolis

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Leal, Taciane Stein da Silva

O núcleo tuberomamilar modula a
nocicepção e a inflamação periférica via
receptor H1 medular / Taciane Stein da Silva
Leal; orientador, Carlos Rogério Tonussi -
Florianópolis, SC, 2016.

131 p.

Tese (doutorado) - Universidade
Federal de Santa Catarina, Centro de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Histamina cetral.
3. Modulação da nocicepção e inflamação.
4. Reflexo da raiz dorsal. I. Tonussi,
Carlos Rogério. II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia.

III. Título.

Folha de rosto

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu marido, Bruno Leal, por estar sempre ao meu lado, por seu amor e por seu total apoio, paciência e compreensão.

Aos meus pais, Paulo Antônio e Maria Marlene, meus exemplos de amor e dedicação. A minha vovó, Ana Alzira, pelo seu carinho e todas as orações.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me guiar, iluminar e conduzir nas minhas escolhas e por me ajudar a concluir com sucesso mais esta etapa da minha vida.

Ao meu orientador Carlos Rogério Tonussi, pela amizade formada nesses sete anos, pela generosidade em compartilhar seus ensinamentos e suas descobertas.

A todos os professores e funcionários do departamento de Farmacologia.

Aos amigos de laboratório e departamento em especial Flora, Lucas, Maíra e Vanessa por toda a amizade, companheirismo e discussões dos experimentos.

Aos alunos de iniciação científica, Franci Ellen e Elba, pela amizade e auxílio na execução dos experimentos.

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos animais utilizados.

RESUMO

A medula espinhal é conhecida por ser um centro de controle ortodrômico (nocicepção) e antidrômico (neuroinflamação) na via nociceptiva. A histamina medular endógena participa da modulação da nocicepção e da inflamação periférica. Estudos prévios relatam o envolvimento do receptor H1 (H1R) medular na nocicepção e de um componente neurogênico na modulação da inflamação periférica. Assim, o nosso objetivo foi analisar o efeito da liberação endógena de histamina através da manipulação farmacológica do núcleo tuberomamilar (TMN) e a participação do receptor H1 medular na modulação da nocicepção e da inflamação periférica em um modelo de monoartite induzida por carragenina/LPS. Inicialmente uma injeção de carragenina foi realizada na articulação do joelho direito dos ratos e 72 depois o LPS foi administrado na mesma articulação. A avaliação da incapacitação e do edema articular iniciou-se 3 horas após o LPS e foi medida por 3 horas. Administração intratecal de histamina aumentou a incapacitação e o edema articular, enquanto os antagonistas do receptor H1 (cetirizina,) diminuiu ambos os parâmetros. O agonista do receptor H3 (impepip) diminuiu tanto a incapacitação quanto o edema, de forma contrária. O antagonista H3 (tioperamida) aumentou a incapacitação e o edema articular. A microinjeção de glutamato no TMNv, causou um aumento na incapacitação e no edema articular, enquanto que a microinjeção de cloreto de cobalto no TMNv inibiu tanto a incapacitação, quanto o edema articular. Além disso, a administração prévia de cetirizina ou bumetanida (um bloqueador do cotransportador Na^+ - K^+ - 2Cl^- , NKCC1) intratecal, previniu o aumento da incapacitação e do edema articular provocado pela microinjeção de glutamato no TMNv. A microinjeção de orexina no TMNv, potencializou a incapacitação e o edema articular. Administração intra-TMNv do antagonista dos receptores de orexina, almorexant, não apresentou efeito sobre a incapacitação e o edema periférico. A histamina pode atuar na medula espinhal através de seus receptores H1 e H3 modulando a nocicepção e a inflamação periférica. O bloqueio medular do receptor H1, inibe a potencialização da incapacitação e do edema decorrente da microinjeção intra-TMNv de glutamato. Similarmente bumetanida inibe a incapacitação e o edema decorrente da microinjeção de glutamato. Consequentemente, isso sugere que o sistema histaminérgico medular pode ser explorado para melhorar a analgesia, bem como o processo inflamatório periférico.

Palavras-chave: receptores histaminérgicos. medula espinhal. nocicepção. Inflamação.

ABSTRACT

The spinal cord is known to be a center that controls both orthodromic (nociception) and antidromic traffic (neuroinflammation) of the sensory pathway. Histamine receptors are known to participate in spinal cord nociceptive transmission and previous studies have suggested that spinal H1 receptors play an important role in the modulation of nociception and the neurogenic component of peripheral inflammation in the modulation. We herein investigated the effect of endogenous histamine release by pharmacological manipulation of tuberomammillary nucleus (TMN) and the participation of the medullary H1 receptor, in a carrageenan/LPS-induced arthritis model. LPS was administered in the same joint 72 h after of carrageenan. The articular incapacitation and the increase of articular diameter were measured 3 h after LPS, and hourly for 3 h. Spinal and intra-TMNv treatments were administered 15 and 20 min before LPS injection in the knee-joint, respectively, and compared with the vehicle-treated group. Intrathecally injected histamine increased the incapacitation and the articular diameter, whereas the H1R antagonist, cetirizine, decreased both parameters. The H3R agonist, imipip, decreased both incapacitation and edema, and the H3R antagonist, thioperamide, increased both parameters. Intra-TMN injection of glutamate potentiated both incapacitation and edema, whereas inhibition with cobalt chloride decreased both parameters. Furthermore, previous spinal administration of a subeffective dose of cetirizine or bumetanide (a blocker of the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransporter, NKCC1), reverted the effect of the intra-TMN glutamate injection on incapacitation and edema. Intra-TMV injection of orexin B increased incapacitation and articular edema, but the antagonist of orexin receptors, almorexant, has no effect on the incapacitation and articular edema. Moreover, combining of orexin B and almorexant inhibit effect of orexin B on incapacitation and edema. Histamine seems to act at the spinal level via H1 and H3 receptors to modulate acute arthritis in rats. An H1 receptor antagonist was found to inhibit the incapacitation and edema potentiated by glutamate administered intra-TMNv. Similarly, bumetanide inhibited the incapacitation and edema potentiated by glutamate administered intra-TMNv. Consequently, our results suggest that histaminergic spinal system has an important role in the transmission of nociception and may be explored for improving analgesia, as well as its peripheral antiinflammatory effects.

Keywords: histaminergic receptors. spinal cord. nociception.
inflammation

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- PRINCIPAIS TRATOS AFERENTES DA NOCICEPÇÃO.	26
FIGURA 2- LOCALIZAÇÃO DO TMN NO HIPOTÁLAMO POSTERIOR E SUAS VIAS DE PROJEÇÕES PELO SNC.	29
FIGURA 3- SISTEMA DESCENDENTE MODULATÓRIO DA NOCICEPÇÃO.	36
FIGURA 4- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DA PAD, DA INIBIÇÃO PRÉ-SINÁPTICA E DO RRD.	41
FIGURA 5- ILUSTRAÇÃO DA INJEÇÃO INTRA-ARTICULAR.	52
FIGURA 6- APARELHO DE DEAMBULAÇÃO.	53
FIGURA 7- MENSURAÇÃO DO EDERMA ARTICULAR.	54
FIGURA 8- FIGURA ILUSTRATIVA DA INJEÇÃO INTRATECAL.	55
FIGURA 9- FOTOMICROGRAFIA DO TMN.	56
FIGURA 10- PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1.	57
FIGURA 11- PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2.	57
FIGURA 12- EFEITO RELACIONADO À DOSE DO LPS SOBRE A INCAPACITAÇÃO (A) E O EDEMA ARTICULAR (B) EM RATOS SENSIBILIZADOS COM CARRAGENINA.	60
FIGURA 13- EFEITOS DA INJEÇÃO INTRATECAL DE HISTAMINA SOBRE A INCAPACITAÇÃO (A) E O EDEMA ARTICULAR (B).	62
FIGURA 14- EFEITOS DA INJEÇÃO INTRATECAL DE CETIRIZINA SOBRE A INCAPACITAÇÃO (A) E O EDEMA ARTICULAR (B).	64
FIGURA 15- EFEITOS DA INJEÇÃO INTRATECAL DE IMMEPIP SOBRE A INCAPACITAÇÃO (A) E O EDEMA ARTICULAR (B).	66
FIGURA 16- EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO MEDULAR DA TIOPERAMIDA SOBRE A INCAPACITAÇÃO (A) E O EDEMA ARTICULAR (B) EM RATOS INDUZIDO LPS.	68
FIGURA 17- EFEITO DA ESTIMULAÇÃO DO TMNV COM GLUTAMATO NOS PARÂMETROS INCAPACITAÇÃO (A) E DIÂMETRO ARTICULAR (B) INDUZIDOS PELA CARRAGENINA/LPS.	70
FIGURA 18- EFEITO DA INIBIÇÃO DO TMNV COM CLORETO DE COBALTO NOS PARÂMETROS INCAPACITAÇÃO (A) E DIÂMETRO ARTICULAR (B) EM UM MODELO DE DOR INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR CARRAGENINA/LPS.	72

FIGURA 19- EFEITO DA ESTIMULAÇÃO DO TMN COM GLUTAMATO APÓS O BLOQUEIO DOS RECEPTORES H1 ESPINHAIS SOBRE OS PARÂMETROS INCAPACITAÇÃO (A) E DIÂMETRO ARTICULAR (B).	74
FIGURA 20- EFEITO DA ESTIMULAÇÃO DO TMNv APÓS A ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE BUMETANIDA PARA OS PARÂMETROS INCAPACITAÇÃO (A) E DIÂMETRO ARTICULAR (B).	76
FIGURA 21- EFEITOS DA COADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DA HISTAMINA E DA BUMETANIDA SOBRE A INCAPACITAÇÃO (A) E O EDEMA ARTICULAR (B) EM RATOS INDUZIDO POR LPS.	78
FIGURA 22- EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DA OREXINA B E DO ANTAGONISTA ALMOREXANT NO TMNv SOBRE OS PARÂMETROS INCAPACITAÇÃO (A) E DIÂMETRO ARTICULAR (B) EM UM MODELO DE DOR INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR CARRAGENINA E LPS.....	80
FIGURA 23- INTERAÇÃO ENTRE O NEURÔNIO HISTAMINÉRGICO, A FIBRA AFERENTE PRIMÁRIA E O NEURÔNIO DE 2ª ORDEM NA TRANSMISSÃO DA INFORMAÇÃO NOCICEPTIVA E INFLAMATÓRIA NO MODELO DA ARTRITE REATIVA.....	96
FIGURA 24- INTERAÇÃO ENTRE O NEURÔNIO HISTAMINÉRGICO, A FIBRA AFERENTE PRIMÁRIA E O NEURÔNIO DE 2ª ORDEM NA TRANSMISSÃO DA INFORMAÇÃO NOCICEPTIVA E INFLAMATÓRIA NO MODELO DA ARTRITE REATIVA – BLOQUEIO DO RECEPTOR H1 E DO COTRANSPORTADOR NKCC1.....	97

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COORDENADAS PADRONIZADAS PARA A MICROINJEÇÃO NO TMNv.....	49
TABELA 2 – DADOS DOS ANIMAIS QUE RECEBERAM A MICROINJEÇÃO INTRACEREBRAL FORA DO TMNv.....	129

LISTA DE ABREVIACÕES

CGRP – Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina;

DA – Diâmetro Articular;

DAG – Diacilglicerol;

GABA - Ácido Gama-Aminobutírico;

IP3 – Inositoltrifosfato;

KCC2 – Cotransportador de Potássio e Cloreto;

LPS – Lipopolissacarídeo;

NKCC1 – Cotransportador Sódio, Potássio e Cloreto;

NMDA - N-Metil D-Aspartato;

NR1 – Sítio para Poliaminas Presente no Receptor NMDA;

NS – Neurônios Nociceptivos Específicos;

PAD – Despolarização do Aferente Primário;

PAG – Substância Cinzenta Periaquedutal;

PKA – Proteína Cinase A;

PKC – Proteína Cinase C;

PLC – Fosfolipase C;

RRD – Reflexo da Raiz Dorsal;

RVM – Medula Ventromedial Rostral;

SNC – Sistema Nervoso Central;

SP – Substância P;

TEP – Tempo de Elevação da Pata;

TMN – Núcleo Tuberomamilar;

TMNdif – Núcleo Tuberomamilar Porção Difusa;

TMNm – Núcleo Tuberomamilar Porção Medial;

TMNv – Núcleo Tuberomamilar Porção Ventral;

WDR – Neurônios de Ampla Faixa Dinâmica;

α -FMH – α - Fluoromethyl Histidine;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. AFECÇÕES ARTICULARES	21
1.2. NEUROBIOLOGIA DA NOCICEÇÃO	23
1.2.1. Mecanismos periféricos da transmissão sensorial.....	23
1.2.2. Mecanismos medulares da transmissão sensorial	24
1.2.3. Mecanismos supra espinhais da transmissão sensorial.....	25
1.2.3.1. O núcleo tuberomamilar e a modulação da dor.....	28
1.2.4. Vias descendentes da modulação da nocicepção.....	34
1.3. O REFLEXO DA RAIZ DORSAL	37
1.3.1. Efeitos do Reflexo da Raiz Dorsal sobre a dor e a inflamação	41
2. OBJETIVOS.....	45
2.1. OBJETIVO GERAL	45
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
3. MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1. ANIMAIS.....	47
3.2. FÁRMACOS, REAGENTES E SOLUÇÕES	47
3.2.1. Fármacos e o respectivo veículo utilizado na diluição	47
3.2.2. Reagentes e soluções.....	48
3.3. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	48
3.3.1. Cânulas	50
3.3.2. Microinjeção intracerebral.....	50
3.4. MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR CARRAGENINA/LPS	50
3.5. TESTES COMPORTAMENTAIS	52
3.5.1. Teste algesimétrico.....	52
3.5.2. Mensuração do edema articular	53
3.6. MÉTODOS.....	54
3.6.1. Injeção intratecal	54
3.6.2. Ciclo estral.....	55
3.7. CONFIRMAÇÃO DO SÍTIO DA MICROINJEÇÃO	56
3.8. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	56
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
4. RESULTADOS	59

4.1.	EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE LPS SOBRE A INCAPACITAÇÃO E O EDEMA ARTICULAR EM RATOS SENSIBILIZADOS COM CARRAGENINA.....	59
4.2.	EFEITOS DA INJEÇÃO DE HISTAMINA INTRATECAL SOBRE A INCAPACITAÇÃO E O EDEMA ARTICULAR INDUZIDO PELO LPS.	61
4.3.	EFEITOS DA INJEÇÃO INTRATECAL DE CETIRIZINA SOBRE A INCAPACITAÇÃO E O EDEMA ARTICULAR INDUZIDO PELO LPS	63
4.4.	EFEITOS DA INJEÇÃO INTRATECAL DE IMMEPIP SOBRE A INCAPACITAÇÃO E O EDEMA ARTICULAR INDUZIDO PELO LPS.	65
4.5.	EFEITOS DA TIOPERAMIDA INTRATECAL SOBRE A INCAPACITAÇÃO E O EDEMA ARTICULAR INDUZIDO PELO LPS	67
4.6.	EFEITOS DO GLUTAMATO INTRA-TMN SOBRE A INCAPACITAÇÃO E O EDEMA ARTICULAR INDUZIDO PELO LPS.	69
4.7.	EFEITOS DO CLORETO DE COBALTO INTRA-TMNV SOBRE A INCAPACITAÇÃO E O EDEMA ARTICULAR INDUZIDO PELO LPS.	71
4.8.	EFEITOS DO GLUTAMATO INTRA-TMN E DA CETIRIZINA INTRATECAL SOBRE A INCAPACITAÇÃO E O EDEMA ARTICULAR INDUZIDA PELA CARRAGENINA/LPS.	73
4.9.	EFEITOS DO GLUTAMATO INTRA-TMN E DA BUMETANIDA INTRATECAL SOBRE A INCAPACITAÇÃO E O EDEMA ARTICULAR INDUZIDO PELO LPS.	75
4.10.	EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE HISTAMINA E BUMETANIDA SOBRE A INCAPACITAÇÃO E O EDEMA ARTICULAR INDUZIDO PELO LPS.	77
4.11.	EFEITOS DA ADMINSTRAÇÃO DA OREXINA B E DO ANTAGONISTA NÃO SELETIVO ALMOREXANT, BEM COMO DA COADMINISTRAÇÃO DESSAS DUAS DROGAS INTRA-TMN SOBRE OS PARÂMETROS INCAPACITAÇÃO E O EDEMA ARTICULAR INDUZIDO PELO CARRAGENINA/LPS.....	79
5.	DISCUSSÃO	81
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	95
7.	REFERÊNCIAS.....	99
8.	ANEXO.....	129

1. INTRODUÇÃO

1.1. Afecções articulares

As patologias articulares englobam um grande número de doenças que têm em comum o comprometimento do sistema musculoesquelético, ou seja, ossos, cartilagem, estruturas peri-articulares (localizadas próximas às articulações, tendões, ligamentos e fáscias) e/ou de músculos. Destacam-se por serem altamente prevalentes, afetando 3 a 8% da população mundial. Essas patologias articulares causam um grande impacto social e econômico, por gerarem importantes morbidades e incapacidades, levando ao afastamento do trabalho e a grande gasto das entidades públicas e privadas (Sociedade Brasileira de Reumatologia, 2005; OMS 2006, IASP 2009).

Dentre as patologias articulares com maior impacto socioeconômico destaca-se a artrite. A artrite é uma doença inflamatória crônica que acomete principalmente as articulações, causando dor, inchaço, rigidez e, em estágios mais avançados da doença, deformidades e perda da mobilidade articular. Com a progressão da doença, os indivíduos portadores de artrite desenvolvem incapacidade para a realização de suas atividades, tanto da vida diária como profissional, além da redução da expectativa de vida (OMS 2006). Entre as artrites, a forma mais prevalente é a osteoartrite, que chega a acometer 30% da população adulta (LAWRENCE et al., 2008), seguida da artrite reumatoide, que apresenta incidência de cerca de 1 % na população mundial (YELIN e KATZ 2009; TÓBON et al., 2010; BRAUN e SIEPER, 2002). As formas mais raras como as espondiloartropatias, dentre elas a artrite reativa, acometem em torno de 0,5 % da população (HELMICK et al., 2008).

A artrite reativa tem distribuição mundial e prevalência estimada de 30 a 40 casos em cada 100.000 adultos e, embora seja frequentemente considerada benigna e auto-limitante, tem-se comprovado causar considerável morbidade e, às vezes, apresentar mau prognóstico (APPEL et al., 2004; TOIVANEN e TOIVANEN, 2004).

Ao contrário do que é encontrado em uma artrite séptica, a cultura do líquido sinovial na artrite reativa é negativa para bactérias, sugerindo que artrite reativa é causada por uma resposta autoimune ou estimulada por antígenos bacterianos que se depositam nas articulações (SELMÍ e GERSHWIN, 2014). Atualmente, a artrite reativa está mais

bem caracterizada e é definida como um episódio artrítico tipicamente agudo, periférico, asséptico e que se desenvolve 1 a 4 semanas após uma infecção primária distante da articulação, localizada preferencialmente no trato gastrointestinal, por diferentes espécies de bactérias Gram-negativas (*Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia* ou *Campylobacter*) ou no trato geniturinário por *Clamidia trachomatis* (KHAN, 2002; APPEL et al., 2004; SELMI e GERSHWIN, 2014).

A artrite reativa é uma doença que acomete principalmente adultos jovens entre 30 – 40 anos sendo a prevalência entre homens e mulheres similar para a artrite desencadeada por uma infecção gastrointestinal. No caso da artrite desencadeada por *C. trachomatis* a prevalência é maior para homens (HANNU, 2011).

A artrite reativa é classificada como uma espondiloartropatia, as doenças articulares desse grupo apresentam como característica o acometimento assimétrico das articulações, a possibilidade de envolvimento da coluna vertebral e a associação como o fator HLA-B27 (PALAZZI et al., 2002).

Inicialmente, foi relacionado o antígeno HLA-B27 como um fator de predisposição ao desenvolvimento da artrite reativa, estima-se que 40 a 60% dos pacientes com artrite reativa são positivos para o fator HLA-B27 (SIEPER et al., 2002). Porém, estudos mais recentes consideram que o antígeno HLA-B27 apresente um papel mais proeminente na cronificação e na severidade da artrite reativa, uma vez que 90 % dos pacientes que evoluem para quadros com mau prognóstico são positivos para o HLA-B27 (LEIRISALO-REPO et al., 1997; HANNU, 2011; SELMI e GERSHWIN, 2014).

O tratamento da artrite visa conscientizar o paciente sobre a doença, aliviar a dor, melhorar a função articular e prevenir ou retardar a progressão da doença. Assim diferentes métodos são associados em busca do alívio dos sintomas, que constam de: (1) tratamento não farmacológico (p. ex. fisioterapia, atividade física, perda de peso, mudança do estilo de vida); (2) tratamento farmacológico (p. ex. analgésicos, anti-inflamatórios não-esteroidais, corticosteroides e imunossupressores); (3) tratamentos invasivos (p. ex. injeções intra-articulares e artroplastia) (FERNANDES et al, 2013; MOTA 2013; SELMI e GERSHWIN, 2014).

A dor é o sintoma que mais compromete a qualidade de vida dos indivíduos que desenvolvem artrite e, infelizmente, o tratamento da dor relacionada à artrite ainda é limitado. Os poucos medicamentos que existem no mercado estão associados a efeitos colaterais graves e/ou a um alto custo, o que dificulta a adesão dos pacientes ao tratamento. Por isso, cada vez torna-se mais evidente a necessidade de novos estudos que busquem alternativas para o tratamento da artrite, através de novos medicamentos ou novas estratégias terapêuticas mais eficazes.

1.2. Neurobiologia da Nociceção

1.2.1. Mecanismos periféricos da transmissão sensorial

As experiências sensoriais iniciam na periferia (superfície da pele, articulações e vísceras), onde os nociceptores respondem a diversos estímulos e conduzem essa informação através das fibras sensoriais para o corno dorsal da medula espinhal (D'MELLO e DICKENSON 2008).

Existem 3 tipos de fibras sensoriais no sistema nervoso periférico, as fibras A β , fibras A δ e as fibras C. Essas fibras são usualmente classificadas de acordo com sua velocidade de condução, diâmetro, espessura de sua mielinização, assim como pela sua responsividade a estímulos sensoriais de diferentes naturezas (térmico, mecânico e químico) ou intensidade (inócuo ou nocivo). As fibras A β têm um diâmetro largo ($> 10 \mu\text{m}$), são densamente mielinizadas e, por isso, apresentam alta velocidade ($30 \text{ a } 100 \text{ m/s}^{-1}$) de condução do potencial de ação. A maioria dessas fibras respondem a estímulos mecânicos não nocivos de baixo limiar. As fibras pouco mielinizadas A δ , possuem pequeno diâmetro ($2 - 6 \mu\text{m}$) e, em sua maioria, conduzem estímulos nocivos térmicos e mecânicos com uma velocidade intermediária ($12 \text{ a } 30 \text{ m/s}^{-1}$). As fibras não mielinizadas C são as fibras de menor diâmetro ($0,4 \text{ a } 1,2 \mu\text{m}$) e apresentam uma baixa velocidade de condução ($0,5 \text{ a } 2 \text{ m/s}^{-1}$) (MILLAN, 1999). Estas fibras são conhecidas como nociceptores polimodais, pois respondem tanto a estímulos nocivos mecânicos, térmicos (acima de 45°C), e químicos de alta intensidade, como a vários estímulos não nocivos (WILLIS, 1985). Um considerável contingente de fibras A δ e C, apresentam ainda um limiar de ativação mecânica altíssima ($> 6 \text{ bar}$). No entanto, mediadores químicos do processo inflamatório reduzem esse limiar, tornando-as sensíveis mesmo a estímulos mecânicos de baixa intensidade. Essas fibras deram origem ao conceito de

nociceptores silenciosos (MCMAHON e KOLTZENBURG, 1990; DMITRIEVA e MCMAHON, 1993; CERVERO, 1994).

Os neurônios que formam os nociceptores apresentam seus corpos celulares nos gânglios da raiz dorsal e trigeminal e conduzem a informação nociceptiva proveniente da periferia de forma altamente organizada para o corno dorsal da medula espinhal e o núcleo trigeminal (FÜRST 1999, TOOD e KOEBERG, 2006).

1.2.2. Mecanismos medulares da transmissão sensorial

No corno dorsal da medula espinhal, os nociceptores do tipo C e algumas fibras A δ realizam conexões com neurônios de segunda ordem localizados nas camadas mais superficiais (lâminas I e II). Outras fibras A δ penetram mais profundamente no corno dorsal, fazendo conexões com neurônios de segunda ordem em camadas mais profundas, camadas essas que predominam as terminações das fibras A β (lâminas III-VI) (FÜRST, 1999; TOOD, 2002).

As fibras aferentes primárias no corno dorsal da medula espinhal ativam um grande número de interneurônios e neurônios de projeção, alguns deles ativados exclusivamente por estímulos nociceptivos, como é o caso dos neurônios nociceptivos específicos (NS) e outros são ativados tanto por estímulos de alta como de baixa intensidade, conhecidos como neurônios de ampla faixa dinâmica (*wide dynamic range* – WDR) (KANDEL et al., 2000).

Os neurônios aferentes primários sintetizam e liberam no corno dorsal da medula espinhal diversas substâncias que estão envolvidas na transmissão e modulação da informação nociceptiva para o SNC (BASBAUM et al., 2009). Entre elas destacam-se o glutamato (JESSEL e DODD, 1986), a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (CGRP) (HÖKFELT et al., 1975; FÜRST, 1999) e o óxido nítrico (NO) (MORRIS et al., 1992).

1.2.3. Mecanismos supra espinhais da transmissão sensorial

Os neurônios de segunda ordem, por sua vez, formam os tratos ou vias supra espinhais ascendentes e projetam-se para estruturas supra espinhais, cada qual para uma estrutura encefálica determinada. Atualmente várias vias ascendentes da dor são conhecidas: tratos espino-talâmico, espino-mesencefálico, espino-reticular (WILLIS, 1985), espino-límbico, espino-cervical, espino-parabraquial e coluna dorsal pós-sináptica (WILLIS e WESTLUND, 1997). Dentre estas, os tratos espino-talâmico, espino-reticular e espinomesencefálico têm sido considerados as vias mais importantes na transmissão aferente da informação nociceptiva.

O trato espino-talâmico projeta suas fibras para o tálamo lateral, região responsável pelo processamento do componente sensorial e discriminativo da dor, ou seja, reflete a análise do estímulo nocivo em termos da sua localização, duração e intensidade. Os tratos espino-talâmico-medial e o espino-parabraquial projetam-se para o tálamo medial e estruturas límbicas, estruturas associadas ao componente emocional e aversivo da dor, ou seja, essas estruturas são responsáveis por identificar o estímulo nocivo como algo desagradável (PRICE, 2002; KUNER 2010).

O tálamo é conhecido como uma das principais estruturas cerebrais envolvida na transmissão da nocicepção no SNC, pois esta é a estrutura responsável pela recepção, integração e transferência do potencial nociceptivo para o córtex cerebral, onde a informação pode ser somatotopicamente organizada (CRAING et al. 1999).

Os tratos espino-parabraquial e espino-mesencefálico projetam a informação nociceptiva para diversos núcleos do tronco cerebral. Essas projeções são particularmente importantes por integrarem a atividade nociceptiva com a homeostática, excitação e processos autonômicos (TRACEY e MANTYH, 2007).

Estudos anatômicos demonstraram que o trato espino-parabraquial projeta-se a partir da lâmina I do corno dorsal da medula espinhal para a área parabraqueal, onde esse trato se divide em duas vias, sendo a informação nociceptiva desviada para a amígdala pela via espino-parabraquial amígdaloide ou para o hipotálamo e o tálamo pela via

espino-parabraquial hipotalâmica (GIESLER 1995; BESTER et al., 1995; BERNARD et al., 1996; MILLAN, 1999) (Figura 1).

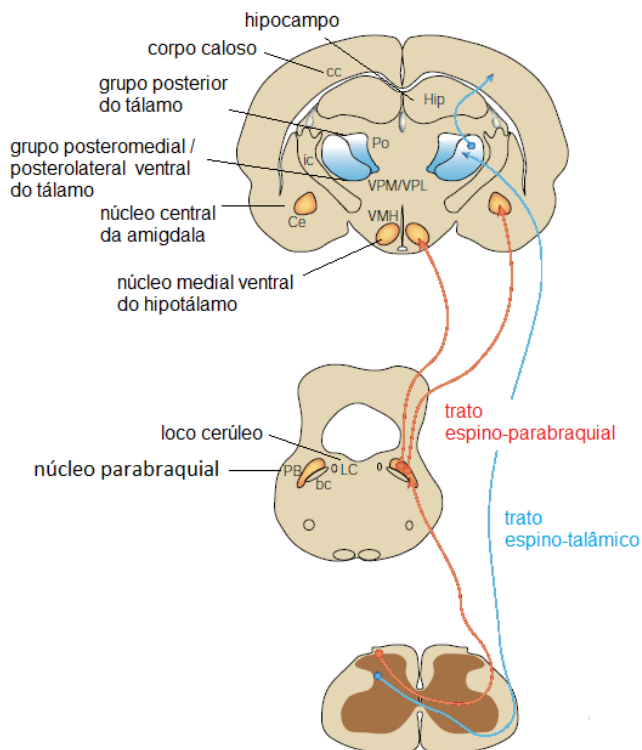


Figura 1- Principais tratos aferentes da nocicepção.

O trato espino-talâmico (azul) tem origem no corno dorsal da medula espinhal e termina no tálamo, onde ocorre o redirecionamento da informação nociceptiva para áreas do córtex relacionadas com o caráter sensorio discriminativo da nocicepção. O trato espino-parabraquial (vermelho), tem sua origem no corno dorsal da medula espinhal e termina em núcleos do hipotálamo e da amígdala, esse trato está relacionado com o caráter emocional e aversivo da nocicepção. (Modificado de HUNT e MANTYH, 2001).

Embora o hipotálamo não seja tradicionalmente associado com o processamento nociceptivo, ele desempenha uma importante função

que está envolvida nas dimensões afetivo-motivacionais, comportamentais e autonômicas do estímulo nocivo (BERNARD et al., 1993; BESTER et al., 1995). De fato, o hipotálamo possui intensa interligação com o núcleo do trato solitário, a substância cinzenta periaquedutal (*periaqueductal gray* - PAG) e a medula ventromedial rostral (*rostral ventromedial medulla* - RVM), juntamente com estruturas corticolímbicas relacionadas com as dimensões afetivas e cognitivas da dor (MILLAN, 1999).

Em adição, alguns núcleos hipotalâmicos estão envolvidos no processamento e no controle descendente da informação nociceptiva. O núcleo pré-óptico medial, através de vias descendentes glutamatérgicas, projeta-se intensamente para a PAG e para RVM (JIANG e BEHBEHANI, 2001). Esse núcleo desempenha importante função nas respostas autonômicas à nocicepção e a sua estimulação inibe a ativação de neurônios espinhais ao estímulo nocivo (LUMB, 1990). Ainda, a estimulação elétrica do hipotálamo lateral produz antinocicepção por meio de projeções para PAG e o núcleo magno da rafe, os quais são responsáveis pela ativação das vias descendentes noradrenérgicas que modulam as respostas nociceptivas para neurônios localizados no corno dorsal da medula espinhal, ou no subnúcleo caudal do complexo trigeminal (DAFNY et al., 1996; HOLDEN e NALEWAY, 2001). Além disso, a estimulação elétrica do hipotálamo anterior suprime a resposta dos neurônios de WDR, localizados no corno dorsal da medula espinhal, aos estímulos nocivos (WORKMAN e LUMB, 1997).

Outro núcleo hipotalâmico relacionado com a modulação central da dor, porém pouco documentado, é o núcleo tuberomamilar (*Tuberomammillary nucleus* - TMN), localizado no hipotálamo posterior. Esse núcleo é rico em neurônios histaminérgicos (PANULA, 1989). Mais recentemente, tem-se relatado a importância dos neurônios histaminérgicos no controle da dor, uma vez que a histamina está envolvida na modulação da transmissão nociceptiva no SNC (MOBARAKEH et al., 2000; SAKURADA et al., 2004; CANNON e HOUGH, 2005).

1.2.3.1. O núcleo tuberomamilar e a modulação da dor

A histamina é amplamente distribuída no SNC de mamíferos (ADAM e HYE, 1966) e apresenta um papel de neurotransmissor e neuromodulador (PRELL e GREEN, 1986), estando envolvida através de seus quatro receptores – H1, H2, H3 e H4 - na regulação de funções fisiológicas como, ciclo do sono e vigília, atividade locomotora, aprendizado, memória e percepção da dor (BROWN et al., 2001; HAAS et al., 2008).

Em humanos (PANULA et al., 1990) e roedores (PANULA et al., 1984) essa amina é produzida por neurônios que possuem o corpo celular localizado exclusivamente no TMN do hipotálamo posterior. Para ratos, Ericson e colaboradores (1987) descreveram uma divisão do TMN em três subnúcleos que levou em consideração localização em relação aos corpos mamilares: tuberomamilar medial (TMNm), tuberomamilar ventral (TMNv) e o tuberomamilar difuso (TMNdif). Mais recentemente outra divisão também foi proposto por Inagakina e colaboradores (1990), nesta o TMN foi dividido em cinco partes, assim o TMNv foi subdividido em parte rostral (E1) e parte caudal (E2), o TMNm foi subdividido em parte dorsal (E3) e parte medial (E4) e, por fim, o TMNdif (E5).

Destes subnúcleos originam-se as projeções dos neurônios histaminérgicos que são emitidas através de duas vias ascendentes e uma descendente para diversas áreas do SNC (PANULA et al., 1989). A via ascendente ventral permanece na superfície ventral do cérebro, innervando o hipotálamo, o septo e o bulbo olfatório, enquanto que a via ascendente dorsal projeta suas fibras dorsalmente ao TMN, innervando o tálamo, o hipocampo, a amígdala, o prosencéfalo e as estruturas rostrais. A via descendente projeta-se para o tronco cerebral e a medula espinhal (PANULA et al., 1984; WATANABE et al., 1983). Na figura 2 observamos a localização do TMN no hipotálamo posterior e as vias de projeção pelo SNC.

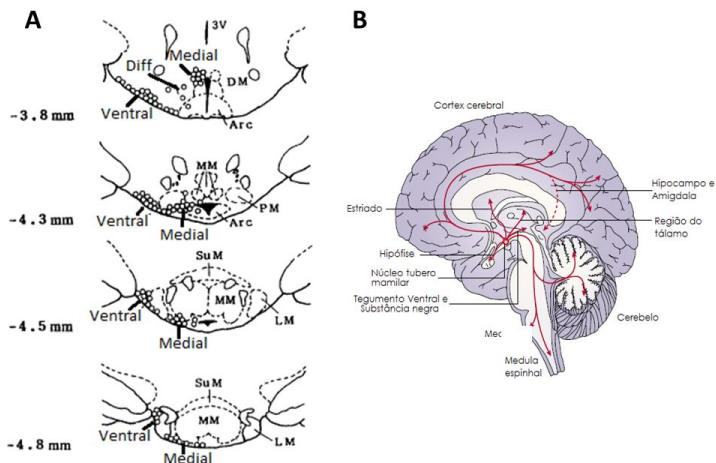


Figura 2- Localização do TMN no hipotálamo posterior e suas vias de projeções pelo SNC.

(A) Representação da localização dos subnúcleos tuberomamilar ventral, tuberomamilar medial e tuberomamilar difuso. (B) Representação das vias de projeções ascendentes innervando a hipófise, o estriado, o hipotálamo, o córtex cerebral, o tálamo, o hipocampo, a amígdala e a via descendente projetando-se para o tronco cerebral e a medula espinhal. DM: núcleo hipotalâmico dorsomedial; Arc: núcleo hipotalâmico arqueado; SuM: núcleo supramamilar; MM: corpo mamilar medial; LM: corpo mamilar lateral; 3V – terceiro ventrículo. (Modificado de TORREALBA et al., 2003; HAAS e PANULA 2003).

Um único neurônio do TMN pode enviar axônios colaterais que formam mais de uma via de projeção (KÖHLER et al., 1985; ERICSON et al., 1987; PANULA et al., 1989). Por isso, no início da década de 90 foi proposto que o TMN era uma única unidade funcional (WADA et al., 1991), com este conceito os autores estavam inferindo que não existia diferença nas funções fisiológicas exercidas por cada um dos subnúcleos do TMN.

Porém, nos últimos anos, pesquisadores têm sugerido que existe uma heterogeneidade na ativação dos subnúcleos do TMN. Uma vez que a liberação de histamina é um indicativo de estresse (VERDIERE et al. 1977; WESTERINK et al., 2002), foi demonstrado que diferentes tipos de estresse, como por exemplo, imobilização, desidratação e hipoglicemia ativam os subnúcleos E4 e E5 do TMN (MIKLOS e

KOVACS, 2003; HAXHIU et al., 2001). Além disso, existem relatos que os neurônios do subnúcleo E2 são ativados por hipercapnia (HAXHIU et al., 2001; JOHNSON et al., 2005).

Além disso, essa heterogeneidade também já foi vista na liberação de histamina em diferentes núcleos do SNC. Munari e colaboradores (2013) demonstraram que o aumento na liberação de histamina a partir da infusão de um antagonista do receptor H3 no TMN, ABT-239, não é igual para as regiões que recebem fibras colaterais histaminérgicas. No trabalho desses pesquisadores, foi demonstrado um aumento na liberação de histamina no TMN, no núcleo basal magnocelular e no córtex pré-frontal, o que não aconteceu no núcleo estriado e no núcleo *accumbens* (MUNARI et al., 2013). Até o presente momento nenhum trabalho demonstrou a existência dessa heterogeneidade dos subnúcleos histaminérgicos para a modulação da nocicepção.

Analisando-se as projeções do TMN, torna-se importante ressaltar que muitas dessas áreas inervadas pelos neurônios histaminérgicos são núcleos relacionados com a percepção e modulação da dor, como o tálamo, a amígdala, os núcleos da rafe, a PAG e o corno dorsal da medula espinhal (PANULA et al., 1984; PANULA et al., 1989a; PANULA et al., 1989b).

Os axônios descendentes histaminérgicos chegam à medula espinhal pelo fascículo longitudinal medial (WAHLESTEDT et al., 1985) através de projeções diretas, a maioria delas ipsilaterais, do TMN para o corno dorsal da medula (TAKADA e HATTORI 1987). A distribuição dessas fibras na medula já foi demonstrada através de técnicas de imunorreatividade e são encontradas no corno dorsal nas lâminas I-III, no corno ventral nas lâminas VII-IX e, por fim, próximo ao canal central na lâmina X (PANULA et al., 1989).

Estudos têm demonstrando que a histamina exerce seus efeitos na modulação da dor, ao nível medular e supra-medular (SAKURADA et al., 2003; YOSHIDA et al., 2005), através de três tipos de receptores histaminérgicos – H1, H2 e H3 (NINKOVIC e HUNT, 1985; BOUTHNET et al., 1988; TRAIFFORT et al., 1992; VISUETE et al., 1997).

As abordagens farmacológicas têm relacionado o envolvimento do receptor H1 na percepção da dor (HOUGH, 1988). Esses resultados

têm sido em parte confirmados e estudos recentes usando camundongos *knockout* para o receptor H1, mostrando diminuição da sensibilidade a estímulos nociceptivos e aumento da analgesia induzida pela morfina (MOBARAKEH et al., 2000; 2002). Em adição, estudos com a α -fluoromethyl histidine (α -FMH), um inibidor da enzima L-histidina descarboxilase, enzima responsável pela síntese da histamina, também apoiam o conceito do envolvimento da histamina na modulação da dor (WATANABE et al., 1990).

Em contraste, a administração espinal de agonista do receptor H3 tem reduzido o comportamento nocifensivo (CANNON et al., 2003; CANNON et al., 2007) que, pelo menos em parte, pode ser devida à ação auto-inibitória desse receptor sobre os neurônios histaminérgicos (ARRANG et al., 1985). O receptor H3 primeiramente foi descrito como sendo um autoreceptor inibitório pré-sináptico do SNC (ARRANG et al., 1983; ARRANG et al., 1987). Posteriormente, estudos revelaram a existência desse receptor como heteroreceptores inibitórios em neurônios pós-sinápticos (POLLARD et al., 1993). Os receptores H3 estão localizados no corpo celular, nos dendritos e nos axônios (varicosidades) onde, por meio de um *feedback* negativo, diminuem a síntese e liberação da histamina (SCHLICKER et al., 1994) e a liberação de vários outros neurotransmissores, como glutamato (BROWN e HAAS, 1999), acetilcolina e noradrenalina no SNC e periférico (ESBENSHADE et al., 2008).

Um importante passo no estudo do envolvimento da histamina na nocicepção foi dado com o desenvolvimento de camundongos *knockout*. Assim foi demonstrado que camundongos *knockout* para a L-histidina descarboxilase apresentavam sensibilidade reduzida aos estímulos dolorosos quando comparados a camundongos selvagens, indicando um efeito da histamina na modulação da dor (YOSHIDA et al., 2005), o que parece não acontecer na dor neuropática, onde foi observado o aumentado comportamento de autotomia (automutilação) em ratos $Hdc^{-/-}$ que passaram por axotomia periférica quando comparados com camundongos selvagens (YU et al., 2013), sugerindo um efeito analgésico da histamina na dor neuropática.

Estudos com a administração de histamina em diversas áreas supramedulares têm sugerido um efeito hiponociceptivo. A histamina atenua o comportamento nocifencivos quando injetada no córtex somatossensorial (TAMADDONFARD e HAMZEH-GOOSHCHI,

2014), córtex cingulado anterior (HAMZEH-GOOSHCHI 2015), no hipocampo (ENFANPARAST et al., 2010), e na PAG (THOBURN et al., 1994). Em geral, a supressão do comportamento nocifencivos nestes estudos foi associada ao receptor de histamina do tipo H2. Contrastando com esses achados, a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de agonistas do receptor H1 tem facilitado o comportamento nocifencivos (MALMBERG-AIELLO et al., 1998; FARZIN et al., 2002). No entanto, a direção do efeito histaminérgico pode depender da dose, uma vez que o efeito modulador da histamina na nocicepção foi alterado de pró- para antinociceptivo com o aumento da dose administrada por via intracerebroventricular (dose < 1µg para > 5 µg) (MALMBERG-AIELLO et al., 1994).

Estudos de microscopia eletrônica e imunohistoquímica no cérebro de roedores mostraram que os neurônios de histamina se projetam densamente para o hipotálamo lateral (ERIKSSON et al., 2001) assim como neurônios do hipotálamo lateral são amplamente distribuídos no TMN (PEYRON et al., 1998; CHEMELLI et al., 1999; HUANG et al., 2001; BAYER et al., 2001; YAMANAKA et al., 2002). O hipotálamo lateral apresenta uma população de neurônios que sintetiza e libera os neuropeptídios orexina A e orexina B (também chamadas de hipocretinas 1 e 2, respectivamente) (PEYRON et al., 1998; SAKURAI et al., 1998; CHEN et al., 1999; SAKURAI, 1999; KILDUFF e PEYRON, 2000).

Os neurotransmissores, histamina e orexina, interagem como parte de uma rede de sistemas (SUNDVIK e PANULA, 2015). Varicosidades neuronais imunorreativas para histamina inervam processos neuronais imunorreativos para orexina, e vice-versa (PANULA et al., 1984; PEYRON et al., 1998; ERIKSSON et al., 2001; SUNDVIK et al. 2011). Vastas projeções neuronais dos dois sistemas se sobrepõem em seus núcleos alvos (SHAN et al., 2015) e muitas das funções biológicas moduladas por esses dois sistemas são compartilhadas (SUNDVIK e PANULA, 2015).

Ambos os neurotransmissores, histamina e orexina, são implicados na modulação das funções cerebrais, como a regulação do sono-vigília, homeostase endócrina e energética, comportamentos motivados por recompensa, função motora e nocicepção (HAAS et al., 2008; PANULA e Nuutinen et al., 2013; BLOUIN et al., 2013; KIYASHCHENKO et al., 2002; MILEYKOVSKIY et al., 2005).

Os terminais axonais dos neurônios de orexina no TMN contêm vesículas de orexina e glutamato (ABRAHAMSON et al., 2001; TORREALBA et al., 2003) e ambos os transmissores excitam neurônios de histamina (ERIKSSON et al., 2001; SCHÖNE et al., 2012). A orexina exerce seus efeitos excitatórios no TMN através dos receptores OX2 (MARCUS et al., 2001; YAMANAKA et al., 2002; MIEDA et al., 2011).

As orexinas atuam através de dois receptores, o receptor de orexina do tipo 1 (OX1) e o receptor de orexina do tipo 2 (OX2). A ordem de magnitude de afinidade das orexina A e a orexina B pelos receptores OX1 e OX2 muda de acordo com o receptor. A orexina A tem uma elevada afinidade para o receptor OX1 e uma afinidade um pouco menor para o receptor OX2, ao passo que a orexina B liga-se principalmente ao receptor OX2 (SAKURAI et al., 1998).

Na literatura encontramos relatos do efeito hiponociceptivo da orexina A e B em diferentes modelos comportamentais, bem como o seu efeito sobre a modulação da dor em diferentes áreas do sistema nervoso central. Dessa forma, temos o relato de que microinjeção de orexina A no RVM apresenta um efeito antinociceptivo no teste da formalina, efeito esse que foi revertido com o bloqueio do receptor OX1 pelo antagonista SB-334867 (AZHDARI-ZARMEHRI et al., 2014). A administração de orexina A intra-PAG apresentou comportamento semelhante, demonstrando um efeito hiponociceptivo na segunda fase da formalina, com a reversão desse efeito pelo antagonista do receptor OX1 (AZHDARI-ZARMEHRI et al., 2011). Além disso, também foi relatada a diminuição da nocicepção térmica após a microinjeção de orexina A na formação reticular em ratos *Sprague-Dawley* (WATSON et al., 2010). O envolvimento do receptor OX2 na modulação da dor também já foi descrito na literatura. Em um recente estudo, Azhdari-Zarmehri e colaboradores (2013) demonstraram o efeito hiponociceptivo dos receptores OX2 no núcleo *accumbens* e na área tegmental ventral em um modelo de dor aguda térmica.

Trabalhos com camundongos *knockout* H1 e H2 demonstraram que eles são mais sensíveis que camundongos selvagens aos efeitos antinociceptivos da orexina A. A injeção i.c.v. de orexina A em camundongos *knockout* H1 e H2 apresentou um efeito antinociceptivo maior que em camundongos selvagens. Além do mais, a co-administração i.c.v. de orexina A e antagonistas dos receptores histaminérgicos H1 e H2

potencializou o efeito analgésico da orexina A nos testes da capsaicina, placa quente e pressão na pata (MOBARAKEH et al., 2005).

1.2.4. Vias descendentes da modulação da nocicepção

O sistema descendente de modulação da nocicepção é caracterizado como uma rede anatômica que permite a regulação do processamento nociceptivo (em grande parte no corno dorsal da medula espinhal) em várias circunstâncias para produzir tanto a facilitação (pronocicepção) ou a inibição (antinocicepção) (FIELDS, 2005).

As vias modulatórias descendentes da dor controlam a liberação de neurotransmissores dos terminais nociceptivos das fibras aferentes primárias no corno dorsal da medula espinhal (FIELDS e BASBAUM, 1994; MILLAN 1997). Isso ocorre diretamente através de seus eferentes serotoninérgicos e catecolaminérgicos (WESTLUND et al., 1990) e indiretamente através da inibição dos interneurônios excitatórios (LIGHT e KAVOOKJIAN, 1988) ou da excitação dos interneurônios inibitórios, os quais, contém os neurotransmissores GABA e glicina (TODD et al., 1996). Além desses, interneurônios opioidérgicos também são ativados pelas vias descendentes modulatórias e inibem tanto as fibras aferentes primárias quanto os interneurônios excitatórios (DUGGAN et al., 1976; BENNETT et al., 1979).

No cenário do controle descendente da dor, destaca-se a PAG, estrutura localizada no mesencéfalo que é reconhecida como uma estrutura capaz de inibir a sensação dolorosa, sendo descrito que suas projeções descendentes reduzem o disparo de aferências nociceptivas no corno dorsal da medula espinhal (JONES e GEBHART, 1988).

A PAG recebe aferências de diferentes origens, tais como o hipotálamo (inclusive TMN e hipotálamo lateral), o córtex pré-frontal e insular, o tálamo, a amígdala, o núcleo cuneiforme, o loco cerúleo entre outros. Os neurônios da PAG contêm encefalinas, SP, GABA, alguns dos quais se projetam para o RVM (SANDKUHLER, 1996). A conexão PAG – RVM é importante para a modulação da dor, uma vez que lesões no RVM impedem a analgesia produzida pela estimulação da PAG (URBAN e SMITH, 1994).

Dentre os núcleos do RVM envolvidos com os mecanismos supressores da dor destacam-se o núcleo magno da rafe, rico em neurônios serotonérgicos, e os neurônios da formação reticular que recebem projeções da PAG, hipotálamo posterior e loco cerúleo, ricos em neurônios noradrenérgicos (FIELDS e BASBAUM 1999). Os neurônios do RVM projetam-se para a medula espinhal, onde inibem a transmissão nociceptiva (BASBAUM e FIELDS 1978).

As vias descendentes modulatórias não exercem funções exclusivamente inibitórias no corno dorsal. Existem evidências nas quais os mecanismos descendentes facilitatórios apresentam ações excitatórias tanto no terminal da fibra aferente primária, quanto na atividade intrínseca dos neurônios do corno dorsal. As vias descendentes inibitórias e facilitatórias podem ser derivadas da mesma estrutura supra espinhais (ALMEIDA et al., 1996).

Tem-se proposto que ambas as vias descendentes estão ativas sob condições normais. No entanto, parece existir predomínio de uma pequena parcela de influência facilitatória na transmissão do sinal nociceptivo (KOVELOWSKY et al., 2000; BEE e DICKENSON, 2007). O balanço entre o nível de atividade nas vias descendentes, facilitatórias e inibitórias, não é estático, e aparece em um estado de fluxo dinâmico devido à influência de vários fatores como a presença de outros estímulos somáticos e de fatores psicológicos como excitação, atenção, expectativa e ansiedade (BEECHER, 1959; MELZACK e WALL, 1982; JANSSEN e ARTNZ, 1996). Tais fatores desempenham um papel crítico na determinação final da experiência da dor, uma vez que decidem a inclinação desse balanço entre os níveis de atividade nas vias de controle descendente, em favor de um estado hiper ou hiponociceptivo.

Presumivelmente, os circuitos neuronais que modulam a dor existem porque a habilidade de suprimir ou aumentar os reflexos nocifensivos e outras respostas normalmente desencadeadas pelo estímulo nocivo aumentam as chances de sobrevivência do indivíduo. Assim, por exemplo, a supressão do reflexo nocifensivo pode facilitar a fuga frente a uma ameaça, enquanto o aumento da dor na presença da lesão tecidual e da inflamação poderia promover recuperação e cura (WATKINS et al., 1995). Na figura 3 temos um esquema das vias descendentes modulatórias da nocicepção.

Como já relatado anteriormente, o corno dorsal da medula espinhal é um importante sítio de modulação da transmissão nociceptiva proveniente da periferia através das fibras aferentes (SLUKA et al., 1994), porém a medula espinhal é também um importante sítio para a modulação da inflamação periférica (WILLIS, 1999).

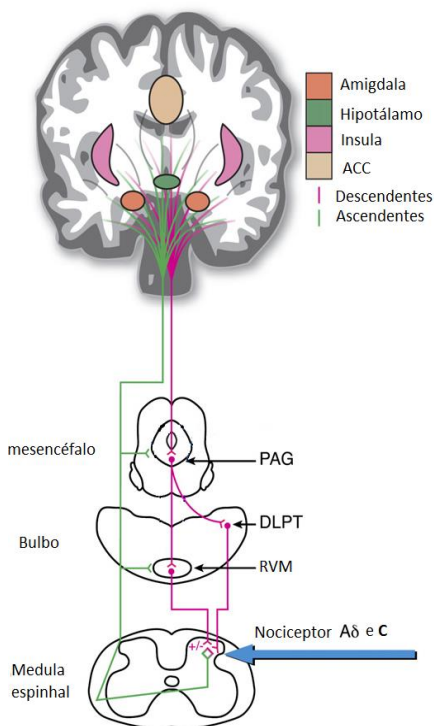


Figura 3- Sistema descendente modulatório da nociceção.

O córtex cingulado anterior (ACC), ínsula e amígdala ativam projeções descendentes diretamente ou via hipotálamo para a substância cinzenta periaquedutal (PAG). A PAG controla os neurônios nociceptivos do corno dorsal da medula espinhal através de conexões no medula ventromedial rostral (RVM) e na região dorso-lateral da ponte (DLPT). O RVM contém neurônios serotoninérgicos e não-serotoninérgicos, os quais se projetam diretamente para o corno dorsal; o DLPT projeta neurônios noradrenérgicos para o corno dorsal diretamente ou via RVM (Modificado de TRACEY e MANTYH, 2007).

1.3. O reflexo da raiz dorsal

A transmissão de uma informação sensorial normalmente ocorre da periferia para o sistema nervoso central através da medula espinhal. Entretanto, sob algumas circunstâncias patológicas (ECCLES et al., 1961; KELLY et al., 2007), onde se evidencia uma despolarização sustentada dos terminais centrais dos neurônios aferentes primários, a transmissão do impulso nervoso pode ser detectada de forma antidrômica, isto é, emergindo da medula espinhal através das raízes dorsais e percorrendo as fibras sensoriais primárias em direção ao terminal sensorial periférico.

Essa descarga retrógrada foi vista primeiramente por Gotch e Horsley em 1891 e é relatada como reflexo da raiz dorsal (*Dorsal Root Reflex* - RRD) (BARROW e MATTHEWS, 1935). Esse reflexo de origem medular potencializa a inflamação, pois libera peptídeos vasoativos nos tecidos periféricos (AVERBECK; REEH; MICHAELIS, 2001; CHOPRA et al., 2000; SLUKA; WILLIS; WESTLUND, 1995).

Para entender como ocorre o RRD, primeiramente precisamos esclarecer o papel fisiológico dos transportadores cátions-clorídricos no tecido nervoso.

Na maioria dos neurônios do SNC a concentração intracelular de cloreto (Cl^-) é mantida pelos cotransportadores de potássio e cloreto (KCC2) e sódio, potássio e cloreto (NKCC1) (BLAESSE et al., 2009). O KCC2 conduz 1 íon potássio e 1 íon cloreto do citoplasma para o espaço extracelular, em contrapartida, o NKCC1 carrega 1 íon sódio, 1 íon potássio e 2 íons cloreto através da membrana celular para o citoplasma (ALVAREZ-LEEFMANS et al., 2001; BLAESSE et al., 2009). O efeito destes cotransportadores é um gradiente de concentração de Cl^- em estado estacionário, em que a abertura de canais de Cl^- (como, por exemplo, por intermédio dos receptores de GABA_A) faz com que ocorra a entrada de Cl^- no neurônio o que hiperpolariza a célula (LATREMOLIERE e WOOLF, 2009). Porém, nos neurônios aferentes primários há um desequilíbrio entre a expressão desses dois cotransportadores, com uma expressão maior do NKCC1 e a expressão baixa ou quase nula do KCC2. Como consequência, a concentração do Cl^- intracelular em neurônios aferentes primários permanece acima do equilíbrio eletroquímico (SCHERRER et al., 2009). Dessa forma, a abertura do canal de Cl^- associado ao receptor GABA_A , gera um efluxo de Cl^- e a consequente

despolarização dos neurônios aferentes primários (SUNG et al., 2000; KUDO et al., 1975). Esse efluxo dos íons cloretos, mediado por GABA_A, nos aferentes primários está ausente em camundongos knockout para o cotransportador NKCC1 (SUNG et al., 2000).

O substrato fisiológico para a deflagração do RRD envolve um processo de despolarização das fibras aferentes primárias na medula espinhal, o que é denominado de PAD (*Primary Afferent Depolarization* – PAD).

A PAD ocorre quando um estímulo aferente ortodrômico (da periferia para a medula) em uma fibra aferente primária despolariza o terminal central de outra fibra aferente primária através de um interneurônio GABAérgico com ligação axo-axônica pré-sináptica (WILLIS, 1999). Essa despolarização do terminal central pelo neurotransmissor GABA só é possível por que a ligação do GABA no receptor GABA_A induz um efluxo de cloreto através da abertura do canal iônico e uma consequente despolarização da membrana do aferente primário, deflagrando o RRD (BLAESSE et al., 2009).

Em condições normais, a PAD, mesmo causando uma despolarização, é um evento inibitório, pois essa despolarização é parcial e ocorre somente no terminal central do aferente primário. Por consequência, há uma redução da amplitude dos potenciais de ação que invadem os terminais pré-sinápticos por encontrarem canais de Na⁺ e de Ca²⁺ já inativados. A redução do tamanho do potencial de ação pré-sináptico resulta em um menor influxo de íons Ca²⁺ para dentro do terminal pré-sináptico e, assim, diminui a quantidade de neurotransmissor a ser liberado na sinapse entre o terminal aferente primário e o neurônio de segunda ordem, caracterizando uma inibição pré-sináptica (CERVERO; LAIRD; GARCIA-NICAS, 2003; WILLIS JR., 1999; WILLIS, 2006) (Figuras 4, A e B).

Essa inibição pré-sináptica consegue impedir que os *inputs* fracos excitem os neurônios de segunda ordem. Assim, esse mecanismo está abafando ruídos desnecessários e impedindo que eles cheguem a centros supra-espinhais responsáveis pelo processamento nociceptivo. Além disso, a inibição pré-sináptica aumenta o contraste sensorial, já que *inputs* mais potentes conseguem ativar neurônios de segunda ordem (BURKE, 2006).

No entanto, sob condições patológicas, como uma inflamação periférica, a despolarização excessiva das fibras sensoriais consegue aumentar a magnitude do PAD e, nesse caso, há uma superação da inibição pré-sináptica e o RRD ocorre, bem como uma hiperatividade dos neurônios de segunda ordem na medula espinhal (Figura 4 C).

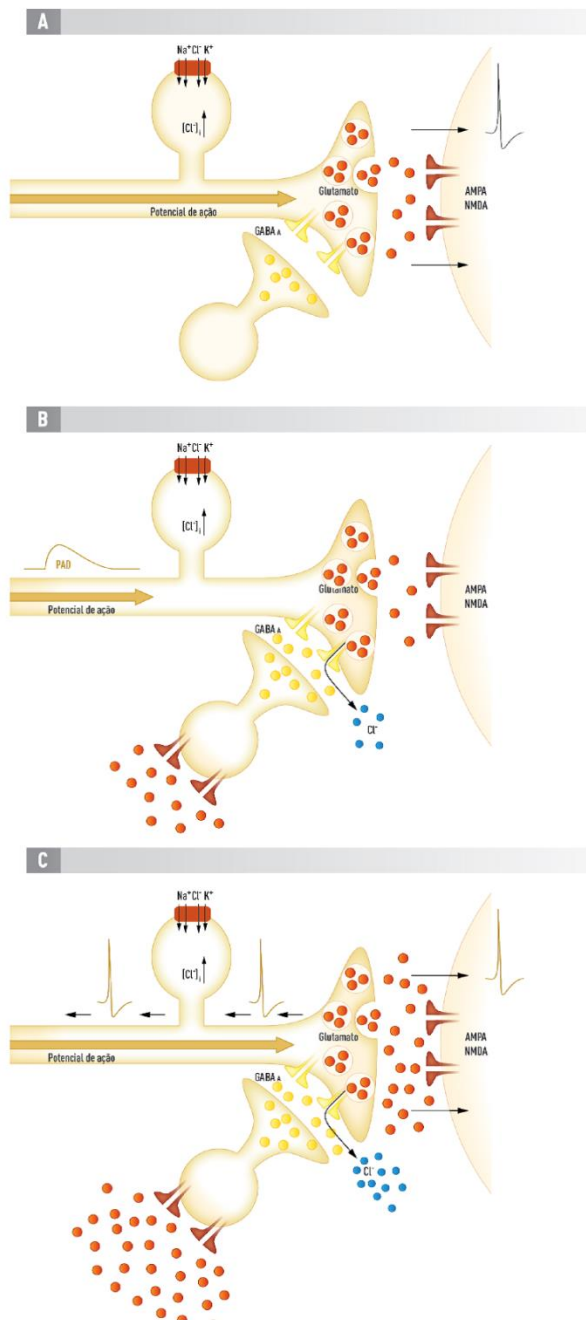


Figura 4- Representação esquemática do mecanismo da PAD, da inibição pré-sináptica e do RRD.

(A) sem a liberação de GABA os potenciais de ação são transmitidos ao longo da fibra aferente. (B) A partir de uma despolarização de interneurônios GABAérgicos de sinapse axo-axônica com aferentes primários ocorre a liberação de GABA, que ao se ligar aos receptores GABAA permite a abertura do canal iônico acoplado ao seu receptor e ocorre o efluxo de Cl^- da célula devido ao acúmulo de Cl^- no meio interno dependente do cotransportador NKCC1 e, assim, uma ligeira despolarização de baixa intensidade ocorre. Por conseguinte, um impulso aferente ortodrômico ao ascender ira encontrar o terminal em despolarização sublimiar inviabilizando a transmissão nociceptiva para a fibra pós-sináptica, ou seja, ocorre uma inibição pré-sináptica. PAD – despolarização do aferente primário. C) Sob condições específicas, a PAD é intensificada a ponto de propagar potenciais de ação de forma bidirecional. PAD – despolarização do aferente primário; RRD – reflexo da raiz dorsal. (FOLETTTO, 2015).

Além da participação do GABA, sugere-se o envolvimento de aminoácidos excitatórios na PAD. Um exemplo é o bloqueio da PAD observado com o antagonista do receptor glutamatérgico não-NMDA, o CNQX (6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona) (EVANS e LONG., 1989). Neste caso, as fibras aferentes primárias estariam liberando aminoácidos excitatórios os quais ativam os receptores não-NMDA em interneurônios GABAérgicos, causando, assim, a liberação de GABA nas sinapses axo-axônicas ou axodendríticas nos terminais aferentes primários na medula espinhal (SLUKA e REES, 1995).

1.3.1.Efeitos do Reflexo da Raiz Dorsal sobre a dor e a inflamação

O RRD pode modular a dor tanto pelo seu efeito central, por causar a liberação de neurotransmissores do terminal central das fibras aferentes primárias na medula espinhal, o que contribui para a geração do potencial de ação pós-sináptico excitatório (ECCLES et al., 1961; ECCLES et al., 1962; DUCHEN, 1986) quanto pelo seu efeito periférico, estimulando a liberação de neuropeptídios no terminal periférico das fibras aferentes primárias culminado com uma excitação ainda maior

destas fibras (LEVINE et al., 1985; SLUKA et al., 1994, REES et al., 1995, LIN et al., 2000).

Em condições normais, a estimulação mecânica nas fibras A β , agindo através do interneurônio GABA, desencadeia a PAD nos terminais nociceptivos e, assim, diminui a transmissão nociceptiva através do mecanismo de inibição pré-sináptica. Durante uma lesão ou inflamação, o PAD evocado por estímulos táteis (fibras A β) pode tornar-se suficiente para evocar RRD nos nociceptores aferentes (SLUKA et al., 2005). O RRD conduzido centripetamente pode excitar neurônios no corno dorsal que são normalmente excitados por nociceptores e então pode causar alodinia tátil (CERVERO e LAIRD, 1996; CERVERO et al., 2003; PRINCE et al., 2005; PITCHER et al., 2007).

Vários estudos fornecem evidências de que o NKCC1 está envolvido no processamento nociceptivo, na geração e manutenção de estados de hiperalgia e inflamação neurogênica (DELPIRE e AUSTIN, 2010). Camundongos *knockout* para NKCC1 exibem um aumento no limiar de dor para o calor nocivo e reduzida alodinia após injeção intradérmica de capsaicina (LAIRD et al. 2004). A administração periférica ou intratecal de inibidores do NKCC1 tem um significativo efeito antinociceptivo no modelo da formalina (GRANADO-SOTO et al., 2005). Em adição, administração subaracnoideade bumetanida, um inibidor do NKCC1, reduziu a atividade antidrômica, a alodinia e a hiperalgia mecânica produzida pela injeção intradérmica de capsaicina (VALENCIA-DE ITA et al., 2006).

Além dos efeitos sobre a excitabilidade neuronal e, consequentemente, sobre a dor, o reflexo da raiz dorsal também modula a inflamação ao causar a liberação de substâncias nos tecidos periféricos, as quais contribuem para um processo denominado de inflamação neurogênica (WILLIS, 1999).

Sabe-se que a estimulação de nervos periféricos induz e/ou aumenta a inflamação local (BAYLISS, 1901) e que esta reação inflamatória pode ser abolida por denervação (JANCSÓ et al., 1967), comprovando o envolvimento de uma ativação eferente dos neurônios aferentes primários neste processo. Além disso, a presença do componente neurogênico parece estar presente em uma variedade de doenças inflamatórias (HERBERT e HOLZER, 2002). Estudos em modelos experimentais de artrite demonstram que após a estimulação

mecânica da articulação, o reflexo da raiz dorsal pode ser registrado em fibras C e contribui para a inflamação neurogênica ao promover o aumento da liberação de neuropeptídeos dos terminais destas fibras presentes na articulação (LEVINE et al., 1985; SLUKA et al., 1994, REES et al., 1995, LIN et al., 2000). Tais neuropeptídeos incluem a substância P e o peptídeo relacionado ao gene calcitonina (CGRP), os quais causam vasodilatação e extravasamento plasmático articular (COLPAERT et al., 1983; YAKSH 1988; ECCLES et al., 1962; SLUKA e WESTLUND, 1993; REES et al., 1993).

A intervenção farmacológica nos cotransportadores NKCC1 é capaz de alterar também o evento inflamatório periférico. A administração intratecal de bumetanida resulta na inibição da deflagração de RRDs induzido por GABA (JANG; JEONG; AKAIKE, 2001; VALENCIA-DE ITA, 2006) e do edema neurogênico induzido por injeção intraplantar de capsaicina (VALENCIA-DE ITA, 2006), sendo relatado, também, a diminuição da migração celular e do aumento do diâmetro articular induzido por lipopolissacarídeo (LPS) com a administração intratecal de furosemida (bloqueador de transportadores de Cl-) (BREISSAN, 2005).

Baseado nestes estudos que demonstram que a histamina e seus receptores podem modular a transmissão nociceptiva medular, nossa hipótese é que a manipulação farmacológica do TMN module a liberação de histamina na medula espinhal, que por sua vez ao atuar em seus receptores estaria interferindo na transmissão do impulso nociceptivo. Por isso a melhor compreensão da interação entre o TMN e a medula espinhal no processamento medular da informação nociceptiva e inflamatória, bem como do envolvimento do receptor H1 pode contribuir para o aperfeiçoamento dos procedimentos analgésicos e antiinflamatórios.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral desse estudo foi evidenciar farmacologicamente a participação do núcleo tuberomamilar (NTM) na modulação da dor e da inflamação articular periférica induzida por carragenina/LPS em ratos Wistar, bem como a participação da medula espinhal nesse processo.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da administração intratecal de histamina, bem como determinar o papel dos seus receptores medulares, H1 e H3, na modulação da incapacitação e no edema articular induzido pela carragenina/LPS;
- Avaliar o efeito da administração de glutamato e de cloreto de cobalto no núcleo tuberomamilar nos parâmetros incapacitação e edema articular induzido pela carragenina/LPS;
- Verificar se o bloqueio do receptor H1 espinhal reverte o efeito da administração intra-TMNv de glutamato sobre a incapacitação e o edema articular induzido pela carragenina/LPS;
- Verificar os efeitos do bloqueio medular dos cotransportadores NKCC1, seguido da administração intra-TMNv de glutamato sobre os parâmetros incapacitação e edema articular induzido pela carragenina/LPS;
- Verificar o efeito da microinjeção de orexina B e do seu antagonista, almorexant, intra-TMNv sobre os parâmetros incapacitação e edema articular induzido por LPS.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Os experimentos foram realizados com ratos Wistar fêmeas da linhagem *Rattus norvegicus*, pesando entre 170-200 gramas. Os ratos foram criados no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, transferidos para o biotério do departamento de Farmacologia após o desmame e, posteriormente, para o Biotério do Laboratório de Neurobiologia da Nocicepção (LANEN). No LANEN, os ratos foram agrupados em caixas contendo 5 animais e mantidos sob temperatura controlada (21 ± 2 °C), ciclo claro/escuro (12 horas claro e 12 horas escuro) e livre acesso à água e ração.

Os experimentos foram realizados entre 8:00 e 18:00 h, após ambientação prévia de pelo menos 30 min dos animais na sala onde o experimento foi realizado. Todos os experimentos foram realizados seguindo os preceitos éticos definidos pela Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP 1983) e aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da UFSC, sob o protocolo PP00723. Todos os esforços foram realizados para minimizar o número de ratos utilizados nos experimentos.

3.2. Fármacos, reagentes e soluções

3.2.1. Fármacos e o respectivo veículo utilizado na diluição

- Carragenina (*kappa/lambda*, BDH Chemicals Ltda.,[®] UK). Veículo: solução fisiológica 0,9%;
- LPS lipopolisacarídeo de *E. coli*, (Difco[®], EUA). Veículo: solução fisiológica 0,9%;
- Histamina (Sigma-Aldrich[®], EUA). Veículo: solução fisiológica 0,9%;
- Antagonista do receptor H1, cetirizina (Galena Química Farmacêutica Ltda[®], Brasil). Veículo: solução fisiológica 0,9%;
- Agonista do receptor H3, imepip (Sigma-Aldrich[®], EUA). Veículo: solução fisiológica 0,9%;
- Antagonista do receptor H3, tioperamida (Sigma-Aldrich[®], EUA). Veículo: solução fisiológica 0,9%

- Glutamato (Sigma-Aldrich®, EUA). Veículo: PBS, pH 7,4;
- Cloreto de Cobalto (Sigma-Aldrich®, EUA). Veículo: PBS, pH 7,4;
- Inibidor do cotransportador NKCC1, Bumetanida (Sigma-Aldrich®, EUA). Veículo: Bicarbonato de sódio 1,29%;
- Orexina (Sigma-Aldrich®, EUA). Veículo: PBS, pH 7,4;
- Antagonista dos receptores de orexina do tipo 1 e 2, almorexante (Sigma-Aldrich®, EUA). Veículo: 0,01 % DMSO + PBS, pH 7,4.

3.2.2. Reagentes e soluções

- PBS (*phosphate buffered Saline*, pH 7,4; Sigma-Aldrich®, EUA);
- DMSO (*dimethyl sulfoxide* – Merck®, EUA);
- Paraformaldeído (solução a 10% em água destilada, Vetec®, Brasil);
- Sacarose (solução a 30% em água destilada, Vetec®, Brasil).

3.3. Cirurgia estereotáxica

A neurocirurgia estereotáxica fundamenta-se no deslocamento tridimensional de um ponto, obedecendo coordenadas determinadas, e que permite a projeção espacial deste ponto, e a localização precisa de qualquer estrutura por ele representada. É usada quando se deseja atuar especificadamente sobre uma determinada estrutura encefálica. Para isso, a cirurgia é realizada com auxílio de um aparelho estereotáxico.

Os ratos foram primeiramente anestesiados por via intraperitoneal (i.p. 0,1 ml/100 g de rato) com uma solução 1:1 de cetamina e xilazina (0,1 ml/100 g de rato). Após a perda do reflexo álgico (que foi verificado pela pressão da pata do animal), eles foram posicionados no aparelho estereotáxico e fixados tanto pelas barras auriculares colocadas nos meatos auditivos quanto pela presilha nasal, que prende os incisivos e o osso nasal. Após o posicionamento, os ratos tiveram a região superior da cabeça tricotomizada e em seguida foi realizada a assepsia desta região com solução de álcool iodado.

O próximo passo foi realizado com uma injeção subcutânea de lidocaína (com 2% de vasoconstritor) na região dorsal da cabeça, com a finalidade de se promover além de uma anestesia local e redução do

extravasamento sanguíneo durante o procedimento cirúrgico. Em seguida, foi realizada uma incisão na pele e a remoção do tecido subcutâneo para visualizar os pontos cranianos de referência: *bregma* e *lambda*. Após a exposição da superfície craniana, um parafuso foi colocado, no osso parietal, a fim de proporcionar melhor aderência do acrílico odontológico derramado, sobre toda superfície craniana exposta no final da cirurgia. O próximo passo foi verificar e corrigir a horizontalidade do crânio através do ajuste das coordenadas do *lambda* e do *bregma*, de forma que tais pontos ficassem com a mesma altura. Depois de corrigida a inclinação, a partir do *bregma*, a torre do estereotáxico com a cânula-guia foi deslocada conforme as coordenadas tridimensionais do TMN porção ventral. As coordenadas foram calculadas a partir do Atlas de Paxino e Watson e padronizadas para ratos fêmeas pesando entre 170 g a 200 g, (tabela 1).

Tabela 1. Coordenadas padronizadas para a microinjeção no TMNV

Local	A.P	M.L.	D.V
Coordenada	– 4,3 mm	– 1,3 mm	– 8,3 mm

A.P.: ântero-posterior; M.L.: meso-lateral; D.V.: dorso-ventral.

As coordenadas AP e ML foram calculadas a partir do bregma (ponto zero) e DV, a partir da superfície externa do osso craniano. No ponto achado, perfurou-se a calota craniana com uma broca odontológica e introduziu-se a cânula-guia. Por fim, despeja-se o acrílico auto-polimerizável que se solidifica rapidamente, agregando todas as peças e impedindo o deslocamento da cânula-guia.

Após o procedimento cirúrgico, os animais receberam injeção intramuscular (0,2 ml/rato) de antibiótico (pentabiótico Veterinário®). Em seguida foram colocados em grupos de 4 ou 5, em gaiolas plásticas com serragem e mantidos em ambiente silencioso e aquecido até a completa restabilização da consciência. Esses animais com as cânulas implantadas foram utilizados para experimentos após um período mínimo de recuperação de sete dias.

Durante o período de recuperação, os mesmos foram observados quanto à manifestação de dor (redução do consumo de ração

e água), além de sinais de sangramento no local da cirurgia, infecção, distensão abdominal, entre outros parâmetros.

3.3.1. Cânulas

As cânulas-guias, implantadas a fim de viabilizar as microinjeções no TMN, foram confeccionadas no laboratório a partir de agulhas hipodérmicas descartáveis 25 X 7,0 mm. Com auxílio do paquímetro (Mitutoyo[®] Brasil) as cânulas foram cortadas e lixadas até o comprimento de 17 mm.

3.3.2. Microinjeção intracerebral

Foram utilizadas agulhas de 19 mm de comprimento e 0,3 mm de diâmetro (confeccionadas a partir de agulhas gengivais), conectadas por um tubo de polietileno (PE10) à microseringa (Hamilton[®]- 5,0 µl). A microseringa foi preenchida com água destilada e com a solução a ser injetada, separadas por uma bolha de ar. O deslocamento desta bolha representava o volume da solução microinjetada e confirmava o sucesso da microinjeção. A agulha possuía 2 mm a mais do que a cânula-guia de maneira que as drogas fossem realmente microinjetadas na TMNv.

Para a microinjeção, o animal foi imobilizado com um pano e a cânula foi cuidadosamente desobstruída com auxílio de uma lima odontológica. Posteriormente, a agulha foi introduzida através da cânula e injetou-se 0,2 µl da solução, durante 60 s. Em seguida, o animal foi recolocado em sua caixa onde permaneceu por 5 min, até ser submetido à injeção intra-articular de LPS.

3.4. Modelo de artrite induzida por carragenina/LPS

O modelo da artrite induzida por carragenina/LPS tem como objetivo induzir uma monoartrite na articulação fêmuro-tibial de ratos. Este modelo experimental foi desenvolvido baseado na artrite reativa, uma monoartrite que se manifesta após infecções primárias extra-articulares (principalmente nos tratos gastrintestinais e genitourinário) causadas por bactérias gram-negativas como a *Yersinia enterocolitica*. Nestes pacientes, encontram-se elementos da membrana celular de bactérias, como o lipopolissacarídeo (LPS), no fluido sinovial das articulações (GRANFORS et al., 1990). Dessa forma, o LPS bacteriano

parece ser um componente importante para a indução da artrite e para a manutenção da resposta inflamatória nesses pacientes (HUPPERTZ et al., 1996).

Além do LPS, traumas prévios na articulação também parecem constituir um fator que predispõe os pacientes para o desenvolvimento deste tipo de artrite. Acredita-se que esses traumas aumentem a sensibilidade das células imunes locais aos elementos bacterianos (MASSON et al., 1985).

Assim, a indução da artrite pelo LPS nesse modelo experimental foi evocada pela injeção de dois compostos na articulação fêmuro-tibial no membro posterior direito. Inicialmente, os ratos receberam uma injeção intra-articular (i.a.) de carragenina (300 µg/20 µL) diluída em solução fisiológica estéril (0,9 %); 72 h após a carragenina, os ratos receberam uma segunda injeção, na mesma articulação pré-tratada com carragenina, de LPS de *Escherichia coli* (LPS; 3 ng/50 µL) diluído em solução fisiológica estéril (0,9 %). A injeção de carragenina tem como objetivo mimetizar um trauma prévio na articulação, amplificando a resposta inflamatória que ocorre após a administração de LPS. A carragenina foi diluída em solução fisiológica estéril e fervida por poucos segundos, após foi mantida em temperatura ambiente e então injetada na articulação.

Para a injeção i.a. os animais foram imobilizados cuidadosamente com uma flanela, de um modo que apenas o terço inferior do abdômen permaneceu livre. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal com a perna direita fletida. Em seguida, o joelho direito foi tricotomizado e, imediatamente após a tricotomia, foi realizado a antisepsia do local com solução de álcool iodado. Com o joelho tricotomizado é possível observar o tendão infrapatelar, uma faixa esbranquiçada longitudinal que ancora a patela ao fêmur e à tíbia, a injeção i.a. de carragenina foi realizada através desse tendão para dentro da cavidade sinovial. Para a realização da injeção, uma agulha (BD Ultra fine; comprimento 8 mm; calibre 0,33 ou 29 gauge) foi introduzida perpendicularmente em cerca de 1/3 do seu comprimento (figura 5).

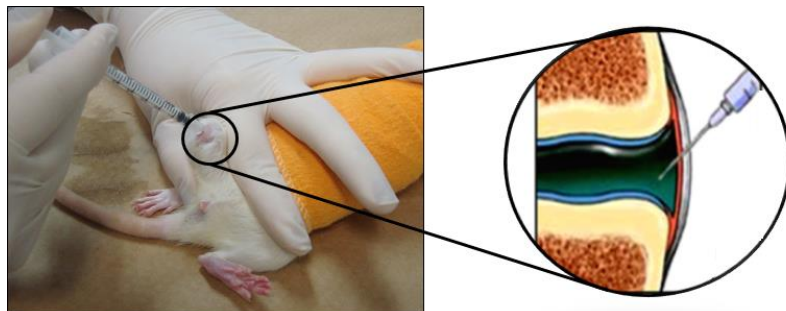


Figura 5- Ilustração da injeção intra-articular.

O diagrama mostra o local da inserção da agulha. Fonte: autoria própria.

Apesar deste modelo ser baseado na artrite reativa, podemos observar características inflamatórias articulares semelhantes a outras patologias articulares, constituindo assim, uma ferramenta útil para identificar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da artrite em humanos.

3.5. Testes comportamentais

3.5.1. Teste algesimétrico

A nocicepção articular foi avaliada pelo sistema de registro de incapacitação articular descrito por Tonussi e Ferreira em 1992. Uma das vantagens deste teste comportamental é que a quantificação da incapacitação articular independe do experimentador, pois é realizada por um sistema de registro computadorizado. Este teste consiste de um aparato eletrônico que permite o registro do estado funcional das articulações. O equipamento consistiu de: 1) cilindro (30 cm de altura e 30 cm de diâmetro) revestido por uma malha trançada em aço inox (2 mm) que gira em uma velocidade constante de 3 r.p.m. 2) sapatilhas metálicas (confeccionadas em folhas de flandres) 3) microcomputador (Figura 6).

O animal foi estimulado a deambular no cilindro por um período de 1 min. Para que o computador registre a incapacitação articular, a sapatilha metálica foi acoplada em cada uma das patas traseiras do animal, mas apenas uma delas (direita) foi conectada ao computador através de um fio condutor. Assim o computador registra o tempo total que aquela pata fica sem tocar a superfície do cilindro durante

o período de 1 min, o que foi denominado de tempo de elevação da pata (TEP; segundos) e constitui a medida de incapacitação articular. Inicialmente antes da administração do LPS, o TEP dos ratos varia entre 10 e 15 s (TEP basal). Observou-se um aumento do TEP somente na pata cuja articulação femuro-tibial recebeu a injeção de carragenina/LPS (BRESSAN e TONUSSI, 2008). A avaliação do TEP iniciou-se três horas após a injeção do LPS e foram realizadas 3 mensurações, nos tempos 3, 4 e 5 h.

No dia anterior a cada experimento, os animais foram ambientados e treinados no sistema de registro de incapacitação articular a fim de aprender a deambular sem cair do cilindro e se adaptar ao uso da sapatilha (Figura 6).

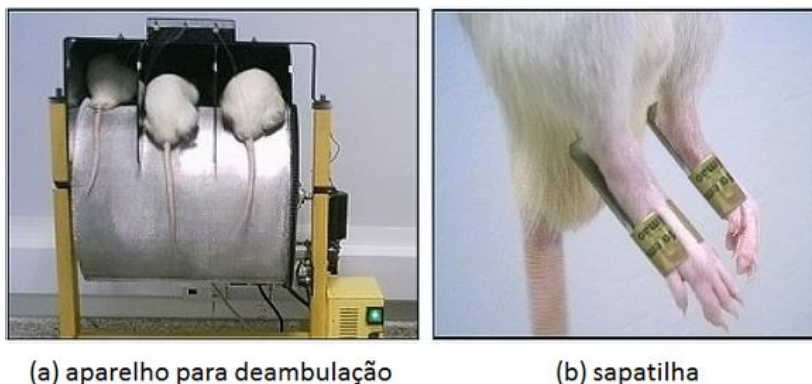


Figura 6- Aparelho de deambulação.

(A) Foto ilustrativa do aparelho utilizada para a avaliação da deambulação do animal. (B) foto da sapatilha acoplada à pata do animal. Fonte: autoria própria.

3.5.2. Mensuração do edema articular

O edema articular pela injeção de carragenina/LPS foi quantificado através da medida do diâmetro da articulação fêmuro-tibial (eixo médio-lateral), com auxílio de um paquímetro (Figura 7). As medidas foram realizadas imediatamente após cada registro do tempo de elevação da pata, sendo uma medida a cada hora por um período total de 3 h. A medida basal do diâmetro articular (tempo 0) foi realizada imediatamente antes da injeção intra-articular de LPS. Para isso, os ratos

foram cuidadosamente imobilizados com flanelas somente pelo tempo necessário para a realização da medida do diâmetro articular. O edema articular foi expresso nos gráficos como a diferença do valor do diâmetro basal e as medidas subsequentes obtidas ao longo das 3 h (expressas em cm).



Figura 7- Mensuração do ederma articular.

Foto ilustrativa da medida do diâmetro articular com auxílio de um paquímetro. Fonte: autoria própria.

3.6. Métodos

3.6.1. Injeção intratecal

Uma das vias utilizadas para a administração dos fármacos nos animais foi a via intratecal. Dessa forma os fármacos foram injetados na medula espinhal ao nível lombar (L5-L6), utilizando o método previamente descrito por MESTRE et al., 1994. Neste procedimento, os animais foram previamente anestesiados com isoflurano (2% em oxigênio) e uma agulha (BD *Ultra fine*; comprimento 12,7 mm; calibre 0,33 ou 29 *gauge*) foi cuidadosamente inserida perpendicularmente no espaço intervertebral entre L5 e L6, até atingir o espaço subaracnoide (Figura 8). Uma movimentação rápida da cauda (*flick*) foi observada, indicando que o espaço subaracnoide foi atingido corretamente e, dessa forma, a injeção foi concluída. Os animais que não apresentaram esse movimento de cauda foram excluídos dos experimentos. O volume máximo injetado por essa via foi de 10 μ l.

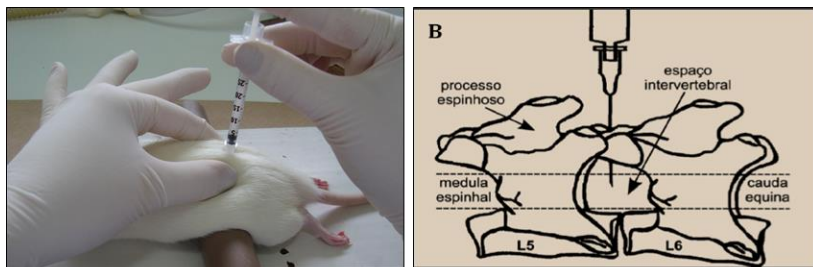


Figura 8- Figura ilustrativa da injeção intratecal.

A figura mostra o local de inserção da agulha no espaço intervertebral entre L5 e L6 para injeção (Adaptado de MESTER et al., 1994).

3.6.2. Ciclo estral

Estudos em roedores apontam que diferenças hormonais ocasionadas pelas variações do ciclo estral podem influenciar a sensibilidade nociceptiva em fêmeas (VINOGRADOVA et al., 2003) e por isso, uma randomização em bloco foi realizada de forma que todos os grupos experimentais eram proporcionais em relação à fase do ciclo estral dos representantes, evitando assim que as alterações nociceptivas avaliadas refletissem uma diferença hormonal entre os grupos e não uma diferença ocasionada pelos tratamentos.

A avaliação do ciclo estral dos animais foi realizada antes do início de todos os experimentos. Para isso, era realizada a lavagem vaginal com salina fisiológica 0,9% com auxílio de uma pipeta de Pasteur. As amostras foram organizadas em uma lâmina e analisadas quanto à morfologia celular no microscópio, isto que as alterações na morfologia do epitélio vaginal estão relacionadas com a flutuação dos níveis de estradiol e caracterizam cada fase do ciclo estral: estro (predomínio de células cornificadas denominadas de “folhas secas”), diestro (predomínio de leucócitos) e proestro (predomínio de células arredondadas dispersas ou agrupadas) (VILELA et al., 2007).

3.7. Confirmação do sítio da microinjeção

Após os experimentos os animais foram profundamente anestesiados e hidratado de cloral 15% (150 mg/kg) com auxílio da cânula-guia fez-se a coloração do sítio de microinjeção, com Azul de Evans (0,5% - 0,2 ul). Em seguida e após a perda completa dos reflexos interdigital, corneal e palpebral, os animais foram perfundidos intracardiamente com solução de salina (0,9 %) seguida por solução de formalina (10%). Após a rigidez muscular, os cérebros foram removidos e armazenados, inicialmente em formaldeído 10% por 24 h, e, em seguida, em solução de sacarose 30% por mais 24 h. Após esse período, os cérebros foram seccionados (cortes de 50 μ m) em um criostato (Leica CM1850), colocados em lâminas gelatinizadas e a localização dos sítios das injeções era realizada através de microscopia, comparando-se os cortes com o diagrama do atlas de cérebro de ratos de Paxinos e Watson (2009) (Figura 9).

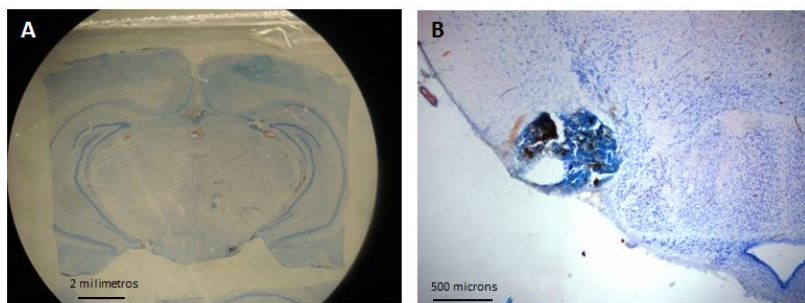


Figura 9- Fotomicrografia do TMN.

Lâmina do TMN de um animal, mostrando o sítio de microinjeção. Em (A) foto com aumento de 16x e (B) foto com aumento de 40x. Corte em plano coronal. Coloração: Giemsa. Fonte autoria própria.

3.8. Protocolos experimentais

Os esquemas abaixo (Figuras 10 e 11) mostram um resumo dos protocolos experimentais adotados no presente estudo.

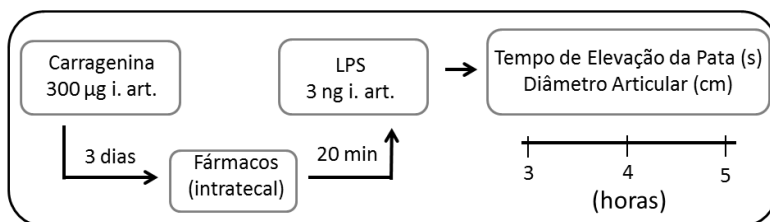


Figura 10- Protocolo experimental 1.

Ratos Wistar fêmeas receberam, inicialmente, uma injeção intra-articular de carragenina. Três dias após a injeção intra-articular de carragenina, os ratos receberam a injeção de LPS na mesma articulação. O tratamento com diferentes fármacos por via intratecal foi realizado 20 min antes da injeção intra-articular de LPS. Três horas após o LPS, iniciaram-se as medidas do tempo de elevação da pata e do diâmetro articular por um tempo máximo de 3 h, sendo realizada uma medida por hora.

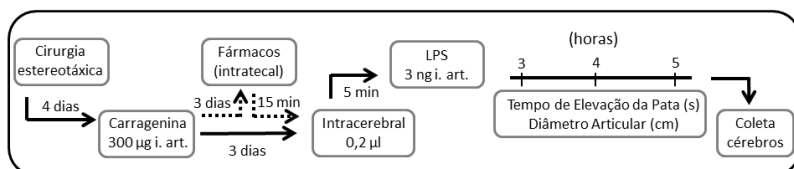


Figura 11- Protocolo experimental 2.

Ratos Wistar fêmeas passaram por uma cirurgia estereotáxica para fixação de uma cânula guia no TMN porção ventral. Após 4 dias de recuperação os animais receberam, inicialmente, uma injeção intra-articular de carragenina. Três dias após a injeção de carragenina, os ratos receberam a injeção de LPS na mesma articulação. O tratamento com diferentes fármacos por via intratecal, quando necessário, foi realizado 15 min antes da microinjeção intracerebral. Cinco minutos após a microinjeção os animais receberam a injeção intra-articular de LPS. Três horas após o LPS, iniciaram-se as medidas do tempo de elevação da pata e do diâmetro articular. Após 3 h de avaliação do tempo de elevação da pata e do diâmetro articular os animais passaram por uma perfusão transcardíaca para coleta do cérebro e verificação do sítio de injeção.

3.9. Análise estatística

A análise foi realizada utilizando o *software* Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK). Os resultados foram expressos como médias \pm erro padrão da média. Para todos os tratamentos, com exceção do cloreto de cobalto, as barras do TEP e do DA representam a média das horas dos animais (3 h, 4 h e 5 h). Para o DA, os valores foram expressos como a diferença do diâmetro articular, mensurado imediatamente antes da injeção intra-articular de LPS e as medidas subsequentes obtidas ao longo das 3 h de avaliação. As diferenças estatísticas entre os grupos foram detectadas com análise de variância (ANOVA) de uma via para medidas simples ou ANOVA de duas vias para medidas simples, quando o nível de significância de pelo menos $P < 0,05$ foi detectado, foi seguido pelo teste de Duncan.

Para o tratamento com cloreto de cobalto, as barras do TEP e do DA representam a média das duas primeiras horas dos animais (1 h e 2 h). Para o DA, os valores foram expressos como a diferença o diâmetro articular mensurado imediatamente antes da injeção intra-articular de LPS e as medidas subsequentes obtidas na primeira e segunda hora após o tratamento. As diferenças estatísticas entre os dois grupos experimentais foram detectadas utilizando o teste *t* não pareado e o resultado foi considerado significativo quando um nível de significância de pelo menos $P < 0,05$ foi detectado.

Os resultados foram representados em gráficos de barras e realizados no GraphPad Prism® 5.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito de diferentes concentrações de LPS sobre a incapacitação e o edema articular em ratos sensibilizados com carragenina

A primeira etapa deste estudo foi determinar uma dose submáxima de LPS que permitisse observar tanto potencialização quanto inibição dos parâmetros avaliados. Assim, uma curva com diferentes concentrações de LPS foi realizada para avaliar o efeito do LPS sobre a incapacitação e o edema inflamatório.

Desta forma, 72 h depois de uma injeção prévia de carragenina (300 µg; 20 µl; articulação), os ratos receberam diferentes doses de LPS - 0,3 ng, 3 ng, 30 ng - diluídos em 50 µl de salina fisiológica estéril 0,9 % na articulação já sensibilizada. O grupo controle recebeu uma injeção intra-articular de salina fisiológica estéril 0,9 % na articulação sensibilizada. O TEP e o DA começaram a ser avaliados a partir da terceira hora após o LPS, sendo realizada uma avaliação a cada hora até a quinta hora após o LPS. Com a administração intra-articular de LPS, foi observado o desenvolvimento de uma incapacitação articular de forma dose dependente (0,3; 3; 30 ng; $P < 0.001$; Figura 12 A). Similarmente, todas as doses aumentaram de forma significativa o diâmetro articular (0,3; 3; 30 ng; $P < 0.001$; Figura 12 B). Sendo assim, a dose de LPS escolhida para dar continuidade ao estudo foi de 3 ng / 50 µl.

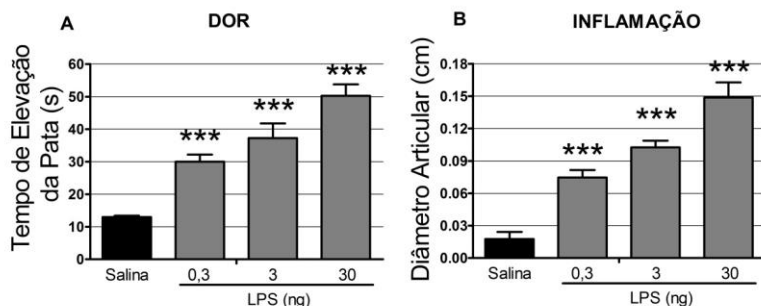


Figura 12- Efeito relacionado à dose do LPS sobre a incapacitação (A) e o edema articular (B) em ratos sensibilizados com carragenina. O LPS (0,3 ng; 3 ng e 30 ng / 50 μ l) foi administrado na articulação do joelho direito dos ratos 72 h após a sensibilização prévia com carragenina (300 μ g; 20 μ l). O grupo controle recebeu 50 μ l de solução fisiológica 0,9 % (salina) no joelho direito. Os resultados representam a média \pm EPM (***) $P < 0,001$). Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Duncan. $F(3,28) = 37,922$, $p = 0,00001$ para TEP e $F(3,28) = 53,471$, $p = 0,00001$ para DA. 8 animais/grupo.

4.2. Efeitos da injeção de histamina intratecal sobre a incapacitação e o edema articular induzido pelo LPS.

O próximo passo desse estudo foi investigar o envolvimento da histamina medular espinhal na modulação da incapacitação e no edema articular induzido por LPS intra-articular (3 ng; 50 μ l).

Para isso, diferentes doses de histamina foram administradas por via intratecal, 20 min antes do LPS intra-articular (em um volume máximo de 10 μ l). Os animais receberam histamina nas doses de 0,002 nmol; 0,2 nmol; 2 nmol e 20 nmol ou salina fisiológica 0,9 %. A administração espinhal da histamina causou um aumento significativo na incapacitação articular (0,002 nmol e 20 nmol; $P < 0,01$ e 0,2 nmol; $P < 0,05$; Figura 13 A) quando comparado com o controle salina. Quanto ao parâmetro inflamação, a histamina medular também aumentou significativamente o diâmetro articular (0,002 nmol e 2 nmol; $P < 0,05$ e 2 nmol; $P < 0,01$; Figura 13 B). Observamos assim, um efeito hipernociceptivo e pró-edematogênico da histamina quando administrada na medula espinhal.

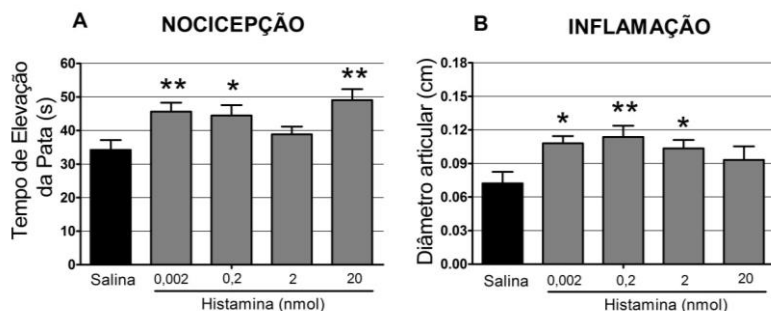


Figura 13- Efeitos da injeção intratecal de histamina sobre a incapacitação (A) e o edema articular (B).

Todos os animais receberam carragenina intra-articular (300 µg; 20 µl), 72 h antes do LPS intra-articular (3 ng/50 µl). A histamina (0,002; 0,2; 2 e 20 nmol/10 µl) foi administrada por via intratecal (L5-L6), 20 min antes da injeção intra-articular de LPS. O grupo controle recebeu solução fisiológica 0,9 % (salina/10 µl). Os resultados representam a média ± EPM (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$); com $F(4, 40) = 4.4143$, $p = 0,0054$ para TEP e $F(4, 40) = 2.8595$, $p = 0,03767$ para DA. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Duncan. 9 animais/grupo.

4.3. Efeitos da injeção intratecal de cetirizina sobre a incapacitação e o edema articular induzido pelo LPS

Após encontrarmos evidências de um efeito hipernociceptivo e pró-edematogênico da histamina espinhal, seguimos com a investigação do envolvimento dos seus receptores histaminérgicos medulares. A literatura relata que o receptor H1 é um dos possíveis envolvidos no efeito nociceptivo da histamina medular (MOBARAKEH et al., 2000; SAKURADA et al., 2003; SAKURADA et al., 2004; STEIN et al., 2016), por isso investigamos seu papel na incapacitação e no edema articular induzido por carragenina/LPS. A escolha das doses testadas baseou-se na constante de inibição dos receptores H1 (Ki) (GILLARD et al., 2002).

Diferentes doses do antagonista do receptor H1, cetirizina, foram administradas na medula espinhal por via intratecal, 20 min depois dos tratamentos espinhal os animais foram sensibilizados com LPS intra-articular (3 ng; 50 μ l). As doses administradas neste experimento foram de 12,6; 126 e 1260 fmoles, ou o controle (salina fisiológica) em um volume máximo de 10 μ l. O antagonismo do receptor H1 produziu um efeito oposto ao observado pela administração da histamina intratecal. Contudo, somente uma das doses do antagonista H1 foi capaz de inibir a incapacitação articular de forma significativa (126 fmoles; $P < 0,05$; Figura 14 A), quando comparada ao controle. Quanto ao edema, a maioria das doses testadas diminuíram significativamente o diâmetro articular (126 e 1260 fmoles; $P < 0,01$; Figura 14 B), quando comparada ao controle salina.

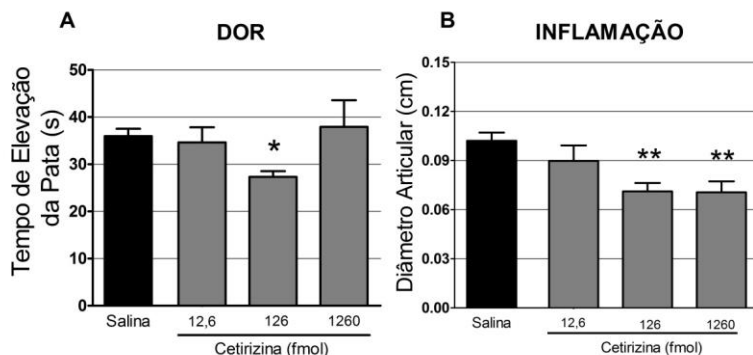


Figura 14- Efeitos da injeção intratecal de cetirizina sobre a incapacitação (A) e o edema articular (B).

Todos os animais receberam carragenina intra-articular (300 μ g; 20 μ l) 72 h antes da injeção intra-articular de LPS (3 ng/50 μ l). A cetirizina (12,6 fmol; 126 fmol e 1260 fmol/10 μ l) foi administrada por via intratecal (L5-L6) 20 min antes da injeção de LPS. O grupo controle recebeu solução fisiológica 0,9 % (salina/10 μ l). Os resultados representam a média \pm EPM, (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$); $F(3,32) = 5,2597$, $p = 0,0046$ para TEP e $F(3,32) = 6,6382$, $p = 0,0013$ para DA. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Duncan. 9 animais/grupo.

4.4. Efeitos da injeção intratecal de immepip sobre a incapacitação e o edema articular induzido pelo LPS.

Nesta etapa do trabalho, avaliamos o envolvimento do receptor H3 medular na modulação da incapacitação e do edema articular. Para isso, iniciamos os experimentos com a administração do agonista do receptor H3, o immepip. A escolha das doses foi baseada na constante de dissociação (K_d) dos receptores H3 (VOLLIGA et al., 1994).

As doses testadas neste experimento foram de 4, 8, 16 e 32 nmoles, ou controle (solução fisiológica) administrados via intratecal em um volume máximo de 10 μ l. Vinte minutos depois dos tratamentos, os animais foram desafiados com LPS intra-articular (3 ng; 50 μ l). Todas as doses testadas inibiram a incapacitação articular de forma significativa (4 nmoles $P < 0,05$; 8 e 16 nmoles $P < 0,01$; Figura 15 A). Já no que diz respeito ao edema articular, somente as menores doses de immepip foram eficazes para reduzir o diâmetro articular dos animais (8 nmoles $P < 0,05$; figura 15 B).

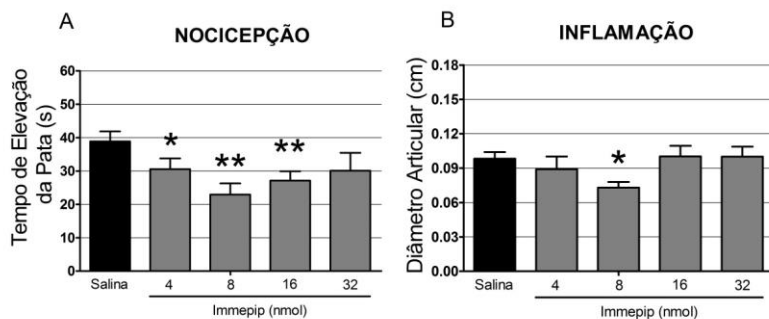


Figura 15- Efeitos da injeção intratecal de immepip sobre a incapacitação (A) e o edema articular (B).

Todos os animais receberam carragenina intra-articular (300 µg; 20 µl) 72 h antes da injeção intra-articular de LPS (3 ng/50 µl). O immepip (4, 8, 16 e 32 nmoles/10 µl) foi administrado por via intratecal (L5-L6) 20 min antes da injeção intra-articular de LPS (3 ng/50 µl). O grupo controle recebeu solução fisiológica 0,9 % (salina/10 µl). Os resultados representam a média ± EPM (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$); $F(4, 40) = 2,9467$, $p = 0,03171$ para TEP e $F(4, 40) = 3,6108$, $p = 0,00196$ para DA. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Duncan. 9 animais/grupo.

4.5. Efeitos da tioperamida intratecal sobre a incapacitação e o edema articular induzido pelo LPS

Uma vez que observamos que a administração exógena do agonista H3, immepip, na medula espinhal gerou um efeito antinociceptivo e anti-edematogênico. O próximo passo foi analisar o papel fisiológico desse receptor através do seu bloqueio medular. Para isso utilizamos o antagonista do receptor H3, tioperamida. O volume máximo injetado intratecal foi de 10 µl e as doses utilizadas neste experimento foram 0,004 nmol, 0,04 nmol, 0,4 nmol e 4 nmol ou controle (solução fisiológica). Essas doses foram baseadas na constante de inibição (K_i) do receptor H3 (HILL, 1997).

O bloqueio do receptor H3 medular produziu efeito oposto ao da sua ativação, pois observamos que as doses intermediárias de tioperamida foram capazes de potencializar de forma significativa a incapacitação articular (0,04 e 0,4 nmol $P < 0,001$; Figura 16 A), quando comparado ao grupo controle. De forma semelhante, a dose de 0,04 nmol potencializou o edema inflamatório (0,04 nmol $P < 0,001$; Figura 16 B) causados pelo LPS (3 ng; 50 µl; i.a).

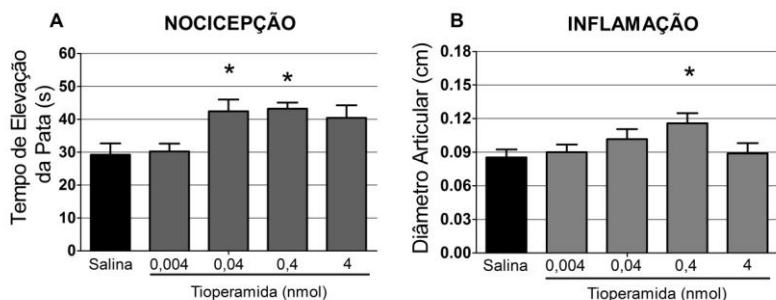


Figura 16- Efeitos da administração medular da tioperamida sobre a incapacitação (A) e o edema articular (B) em ratos induzido LPS.

Todos os animais receberam carragenina intra-articular (300 µg; 20 µl), 72 horas antes da injeção intra-articular de LPS (3 ng/50 µl). O antagonista H3 tioperamida (0,004 nmol; 0,04 nmol; 0,4 nmol e 4 nmol / 10 µl) foi administrado por via intratecal (L5-L6) 20 minutos antes da injeção intra-articular de LPS. O grupo controle recebeu solução fisiológica 0,9 % (salina / 10 µl). Os resultados representam a média ± EPM, (* $P < 0,05$); $F(4,40) = 4,7798$, $p = 0,00302$ para TEP e $F(4,40) = 2,5379$, $p = 0,05478$ para DA. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Duncan. 9 animais/grupos.

4.6. Efeitos do glutamato intra-TMN sobre a incapacitação e o edema articular induzido pelo LPS.

Na próxima etapa do estudo, nosso objetivo foi estudar o papel da histamina medular endógena na incapacitação e no edema articular induzido por LPS e, para isso, padronizamos a cirurgia estereotáxica para canular o núcleo responsável pela produção e liberação da histamina neuronal na medula espinhal, o TMNv.

A ferramenta farmacológica utilizada para estimular o núcleo tuberomamilar porção ventral (TMNv) foi o glutamato, e a concentração escolhida foi 20 nmol. A concentração de glutamato utilizada foi baseada em trabalhos da literatura que realizavam a estimulação de diferentes núcleos do SNC (LINO-DE-OLIVEIRA et al., 2008).

Nessa nova etapa dos experimentos, nosso primeiro passo foi estimular o TMNv com uma microinjeção de glutamato (20 nmol; 0,2 µl por min e no sítio). Para a indução da artrite experimental os animais receberam uma injeção intra-articular de carragenina na articulação do joelho direito (300 µg; 20 µl), 72 h após essa primeira injeção, os animais receberam o LPS intra-articular (3 ng; 50 µl), cinco minutos após a injeção intra-TMNv de glutamato foi realizada. Três horas após o LPS, as avaliações do tempo de elevação da pata e edema articular foram iniciadas e foram avaliadas as 3 horas subsequentes. Assim, observamos um aumento significativo da incapacitação articular ($P < 0,01$; Figura 17 A) e do edema inflamatório articular ($P < 0,05$; Figura 17 B) para o grupo que recebeu a microinjeção intra-TMNv de glutamato, quando comparado com o grupo que recebeu a microinjeção de veículo (PBS).

Na figura 19 um grupo experimental recebeu apenas carragenina/LPS na articulação, sem passar pela cirurgia estereotáxica. Podemos observar que esse grupo se comportou nos parâmetros analisados de tempo de elevação da pata e edema articular, de forma muito semelhante ao grupo experimental que recebeu PBS intra-TMNv.

Após o processamento dos cérebros para averiguar o sítio da microinjeção, observamos que 4 animais do grupo glutamato e 2 do grupo PBS receberam a microinjeção em outras estruturas. Os animais em que as microinjeções não foram no TMNv, não foram agrupados para a análise estatística (ver Anexo, Tabela 2).

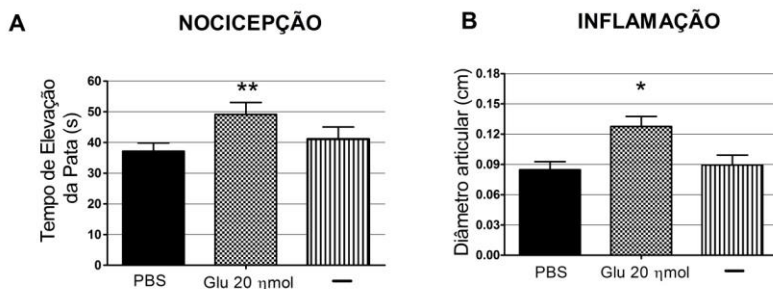


Figura 17- Efeito da estimulação do TMNv com glutamato nos parâmetros incapacitação (A) e diâmetro articular (B) induzidos pela carragenina/LPS.

Todos os animais receberam carragenina intra-articular (300 µg; 20 µl), 72 h antes da injeção intra-articular de LPS (3 ng/50 µl). A injeção intra-TMN foi realizada 5 min antes do LPS. Neste experimento os grupos avaliados foram: LPS i.a (3 ng; 50 µl; 8 animais - grupo sem cirurgia estereotáxica); LPS i.a. (3 ng; 50 µl) + glutamato no TMNv (20 nmol; 0,2 µl; 8 animais); LPS i.a. (3 ng; 50 µl) + veículo no TMNv (PBS; 0,2 µl; 7 animais); ANOVA de uma via seguido do teste Duncan. (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$); $F(2,23) = 2,9739$, $p = 0,07192$ para TEP e $F(2, 23) = 6,2165$, $p = 0,00724$ para DA.

4.7. Efeitos do cloreto de cobalto intra-TMNv sobre a incapacitação e o edema articular induzido pelo LPS.

Após a estimulação TMN, o próximo passo realizado para entender o efeito do TMN na modulação da nocicepção e do edema periférico foi o bloqueio do TMN com cloreto de cobalto (1mM; 0,2 µl / 1 min por sítio).

O cloreto de cobalto apresenta a característica de produzir um bloqueio temporário dos canais de Ca^{2+} voltagem dependente, com a particularidade de não causar lesão permanente por não haver a morte neuronal, não bloqueia fibras de passagem e não ativar mecanismos compensatórios de regiões adjacentes (KRETZ, 1984). Devido à característica farmacocinética do cloreto de cobalto de rápido bloqueio neuronal, as avaliações da incapacitação e do edema articular nesse grupo experimental foram realizadas apenas nas duas primeiras horas.

A escolha da concentração utilizada no presente estudo foi baseada em trabalhos da literatura que utilizaram essa ferramenta farmacológica para realizar o bloqueio sináptico (STERN et al., 2010; GRANJEIRO et al., 2012).

A administração do cloreto de cobalto foi realizada 5 min antes da injeção intra-articular de LPS (3 ng; 50 µl). O tempo de elevação da pata e o edema articular foram avaliados e o resultado foi uma inibição da nocicepção ($P < 0,01$; Figura 18 A) e da inflamação periférica ($P < 0,01$; Figura 18 B) nas duas primeiras horas.

Quatro animais do grupo cloreto de cobalto e 4 animais do grupo PBS receberam a microinjeção em outras estruturas. Os animais que receberam as microinjeções fora do TMN não foram agrupados para análise estatística (ver Anexo, tabela 1).

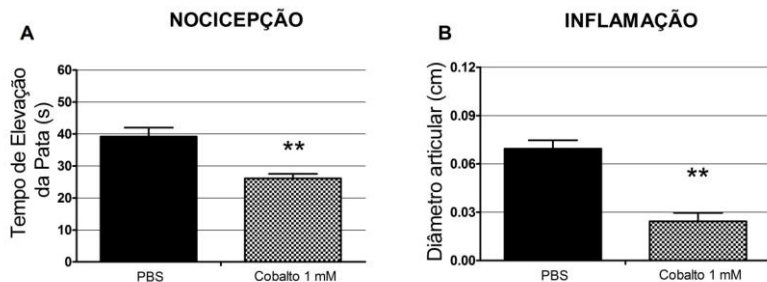


Figura 18- Efeito da inibição do TMNv com cloreto de cobalto nos parâmetros incapacitação (A) e diâmetro articular (B) em um modelo de dor inflamatória induzida por carragenina/LPS.

Todos os animais receberam carragenina intra-articular (300 μ g; 20 μ l), 72 horas antes da injeção intra-articular de LPS (3 ng/50 μ l). A microinjeção no TMNv ocorreu 5 minutos antes da sensibilização dos animais com LPS. Neste gráfico temos os grupos experimentais: cloreto de cobalto no TMNv (1 mM; 0,2 μ l; 8 animais); veículo no TMNv (0,2 μ l; 7 animais). Teste *t* não pareado. (** $P < 0,01$). $F(1,14) = 17,839$, $p = 0,00085$ para TEP e $F(1,14) = 54,461$, $p = 0,0000$ para DA.

4.8. Efeitos do glutamato intra-TMN e da cetirizina intratecal sobre a incapacitação e o edema articular induzida pela carragenina/LPS.

O próximo passo na investigação do envolvimento da histamina central no processo de modulação da dor e da inflamação periférica foi avaliar o papel do receptor H1 medular na nocicepção e no edema inflamatório.

Primeiramente administramos por via intratecal uma dose subefetiva do antagonista do receptor H1 (cetirizina, 12,6 moles / 10 µl) ou o seu veículo (salina fisiológica 0,9 % 10 µl) e 15 min após essa primeira intervenção, realizamos a estimulação do TMNv com uma microinjeção de glutamato (20 nmol; 0,2 µl; por minuto no sítio) ou seu veículo PBS (0,2 µl; por minuto no sítio). Por fim, 5 min depois da microinjeção de glutamato os animais foram desafiados com o LPS intra-articular (3 ng; 50 µl). Três horas após o LPS, as avaliações do tempo de elevação da pata e edema articular foram iniciadas.

Neste experimento os tratamentos foram: PBS intra-TMNv/salina i.t.; PBS intra-TMNv/cetirizina i.t.; glutamato intra-TMNv/salina i.t.; glutamato intra-TMNv/cetirizina i.t.

Assim, a administração de glutamato intra-TMNv/salina i.t. causou um aumento significativo no TEP ($P < 0,05$; Figura 19 A), bem como no diâmetro articular ($P < 0,05$; Figura 19 B), quando comparado com a administração de PBS intra-TMNv/salina i.t. Quando comparamos o grupo glutamato intra-TMNv/salina i.t., com o grupo glutamato intra-TMNv/cetirizina i.t. obtivemos que o bloqueio medular dos receptores H1 com a dose subefetiva de cetirizina reverteu o efeito hipernociceptivo ($P < 0,001$; Figura 19 A) e pró-edematogênico ($P < 0,001$; Figura 19 B) da estimulação glutamatérgica do TMNv.

Após a verificação do sítio de injeção, observamos que 3 animais do grupo PBS/salina i.t.; 2 animais do grupo PBS/CTZ i.t.; 3 animais do grupo glutamato/salina e 4 do grupo glutamato/cetirizina, receberam a microinjeção em outras estruturas. Todos os animais que receberam as microinjeções fora do TMN não foram agrupados para a análise estatística (dados no Anexo, Tabela 2).

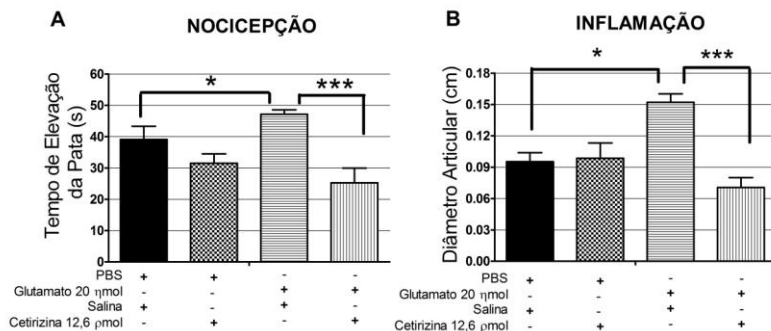


Figura 19- Efeito da estimulação do TMN com glutamato após o bloqueio dos receptores H1 espinhais sobre os parâmetros incapacitação (A) e diâmetro articular (B).

Todos os animais receberam carragenina intra-articular (300 µg; 20 µl), 72 horas antes da injeção intra-articular de LPS (3 ng/50 µl). O tratamento intratecal (cetirizina 12,6 fmol ou salina fisiológica) foi realizado 15 minutos antes das microinjeções no TMNv (glutamato 20 nmols ou PBS; 0,2 µl) e a sensibilização dos animais com LPS foi realizada 5 minutos após a micro-injeção. O n de cada grupo experimental foi: PBS intra-TMNv/salina i.t. (7 animais); PBS intra-TMNv+cetirizina i.t. (8 animais); glutamato intra-TMNv/salina i.t. (7 animais); glutamato intra-TMN/cetirizina i.t. (7 animais). ANOVA de duas vias seguido do teste Duncan, (* p < 0,05; *** p < 0,001). F (1,28) = 5,8636, P = 0,02375 para TEP e F (1,28) = 18,03, p = 0,0003 para DA.

4.9. Efeitos do glutamato intra-TMN e da bumetanida intratecal sobre a incapacitação e o edema articular induzido pelo LPS.

Uma possível explicação para o efeito observado sobre a inflamação é a deflagração do RRD na medula espinhal. Para verificar o envolvimento do RRD na gênese do edema inflamatório induzida pela carragenina/LPS, administramos bumetanida por via intratecal com o objetivo de bloquear os cotransportadores NKCC1.

Primeiramente realizamos uma injeção intratecal de bumetanida (60 µg/10 µl) ou seu veículo bicarbonato 1,26 % (10 µl), 15 min após essa primeira intervenção farmacológica, os animais receberam a microinjeção de glutamato (20 nmol: 0,2 µl por min no sítio) ou PBS (0,2 µl por min no sítio) e por fim, 5 min após a microinjeção os animais foram desafiados com o LPS (3 ng; 50 µl).

Assim, a administração de glutamato intra-TMNv/bicarbonato de sódio i.t. causou um aumento significativo no TEP ($P < 0,001$; Figura 20 A), bem como, no diâmetro articular ($P < 0,01$; Figura 20 B), quando comparado com a administração de PBS intra-TMNv e bicarbonato de sódio i.t.

Quando comparamos o tratamento glutamato intra-TMNv/bicarbonato de sódio i.t., com o tratamento glutamato intra-TMNv/bumetanida i.t. obtivemos uma redução significativa do TEP e do DA, demonstrando assim, que a bumetanida reverteu o efeito hipernociceptivo ($P < 0,001$; Figura 20 A) e pró-edematogênico ($P < 0,001$; Figura 20 B) da estimulação glutamatérgica do TMNv.

Os animais que receberam as microinjeções fora do TMN não foram agrupados para análise estatística (ver Anexo, tabela 2).

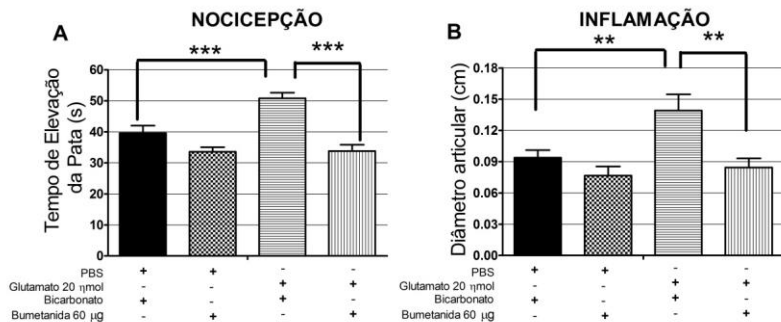


Figura 20- Efeito da estimulação do TMNv após a administração intratecal de bumetanida para os parâmetros incapacitação (A) e diâmetro articular (B).

Todos os animais receberam carragenina intra-articular (300 µg; 20 µl), 72 horas antes da injeção intra-articular de LPS (3 ng/50 µl). O tratamento intratecal (bumetanida 60 µg ou bicarbonato de sódio 1,26 %; 10 µl) foi realizado 15 minutos antes das microinjeções no TMNv (glutamato 20 nmols ou PBS; 0,2 µl) e a sensibilização dos animais com LPS foi realizada 5 minutos após a micro-injeção. Os grupos experimentais foram: PBS intra-TMNv/bicarbonato de sódio i.t. (9 animais); PBS intra-TMNv/bumetanida i.t. (9 animais); glutamato intra-TMN/bicarbonato de sódio i.t. (8 animais); glutamato intra-TMN e bumetanida i.t. (8 animais). ANOVA de duas vias seguido do teste Duncan (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). $F(1, 30) = 7,5713$, $p = 0,00996$ para TEP e $F(1, 30) = 1,5601$, $p = 0,22131$ para DA.

4.10.Efeitos da administração intratecal de histamina e bumetanida sobre a incapacitação e o edema articular induzido pelo LPS.

Nesta etapa do estudo, nosso objetivo foi evidenciar o papel do RRD na potencialização do edema inflamatório ocasionado após a administração intratecal de histamina.

Para este experimento os grupos testados foram: histamina (0,2 nmol); bumetanina (60 µg); histamina + bumetanida (nas concentrações 0,2 nmol e 60 µg respectivamente) ou controle (solução bicarbonato de sódio 1,26%), todos os tratamentos foram administrados via intratecal em um volume máximo de 10 µl. Vinte minutos depois dos tratamentos, os animais foram desafiados com LPS intra-articular (3 ng; 50 µl). Todos os animais receberam a carragenina intra-articular (300 ug/50 ul) 72 horas antes do LPS.

Neste experimento, observamos que a administração intratecal de histamina potencializou a nocicepção ($P < 0,05$; Figura 21 A) e a inflamação periférica ($P < 0,05$; Figura 21 B), induzida por LPS na articulação dos ratos. A administração da bumetanida não alterou os parâmetros avaliados (Figura 21 A e B), porem a coadministração de histamina + bumetanida reverteu o efeito da bumetanida para o parâmetro edema articular ($P < 0,001$; Figura 21 B) e não apresentou efeito sobre a incapacitação articular (Figura 21 A).

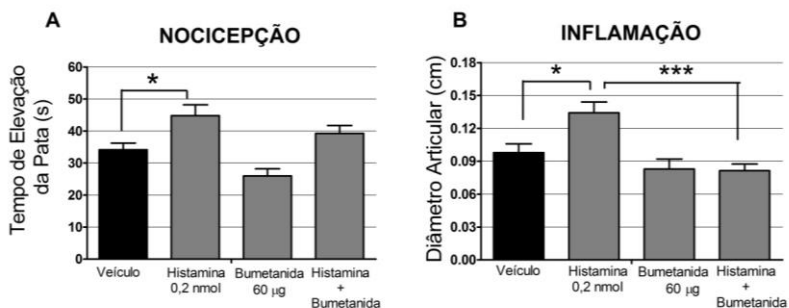


Figura 21- Efeitos da coadministração intratecal da histamina e da bumetanida sobre a incapacitação (A) e o edema articular (B) em ratos induzido por LPS.

Todos os animais receberam carragenina intra-articular (300 µg; 20 µl), 72 horas antes da injeção intra-articular de LPS (3 ng/50 µl). Os tratamentos de histamina (0,2 nmol/10 µl), bumetanida (60 µg/10 µl), histamina + bumetanida (0,2 nmol/10 µl e 60 µg/10 µl, respectivamente) e veículo (solução de bicarbonato de sódio 1,26%/10 µl). Foram administrados por via intratecal (L5-L6) 20 minutos antes da injeção intra-articular de LPS. Os resultados representam a média ± EPM, (* $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$); $F(3,28) = 9,7976$, $p = 0,00014$ para TEP e $F(3,28) = 8,5478$, $p = 0,00035$ para DA. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Duncan. 8 animais/grupos.

4.11.Efeitos da administração da orexina B e do antagonista não seletivo almorexant, bem como da coadministração dessas duas drogas intra-TMN sobre os parâmetros incapacitação e o edema articular induzido pelo carragenina/LPS.

A orexina é um importante peptídeo excitatório com potente ação sobre neurônios do TMN através receptores OX2 (ERIKSSON et al., 2001; MARCUS et al., 2001). O almorexant é um antagonista não seletivo dos receptores de orexinas, que bloqueia os efeitos excitatórios das orexinas (tanto a orexina A quanto a B) (BRISBARE-ROCH et al., 2007). Assim, nosso objetivo nesta etapa do trabalho foi utilizar uma ferramenta farmacológica que mimetiza a ativação e a inibição endógena dos neurônios histaminérgicos. Para isso utilizamos a orexina B e o antagonista não seletivo almorexant.

A concentração utilizada da orexina B baseou-se em estudos da literatura que demonstraram que essa dose é eficaz em aumentar a excitabilidade neuronal (KOROTKOVA et al., 2002; KATAYAMA et al., 2005). Já a concentração do antagonista almorexant baseou-se no estudo de PORTELLE et al., (2015) que demonstrou que essa concentração é suficiente para bloquear os receptores OX2.

Assim, esse experimento foi composto pelos grupos orexina B intra-TMNv (300 nM; 0,2 µl); almorexant intra-TMNv (10 µM; 0,2 µl); Orexina B + almorexant (300 nM e 10 µM respectivamente; 0,2 µl) e, por fim, o veículo PBS + 0,01% DMSO (0,2 µl). Cinco minutos depois das microinjeções, a injeção intra-articular com LPS foi realizada (3 ng; 50 µl). Os parâmetros tempo de elevação da pata e diâmetro articular foram avaliados como nos outros experimentos. Assim, observamos que a administração de orexina B no TMNv potencializou a nocicepção ($P < 0,05$; Figura 22 A) e o edema articular ($P < 0,05$; Figura 22 B) quando comparado com o controle PBS no TMNv, ao passo que a administração do almorexant não alterou os parâmetros analisados de nocicepção (Figura 22 A) e inflamação periférica (Figura 22 B), quando comparado com o seu veículo administrado no TMNv. Porém, na coadministração da orexina B + almorexant, o provável bloqueio do receptor OX2 preveniu os efeitos excitatórios da orexina B sobre a nocicepção ($P < 0,01$; Figura 22 A) e a inflamação periférica ($P < 0,01$; Figura 22 B).

Após a verificação do sítio de injeção, observamos que 2 animais do grupo orexina B intra-TMNv. Os animais que receberam as

microinjeções fora do TMN não foram agrupados para análise estatística (ver Anexo, Tabela 2).

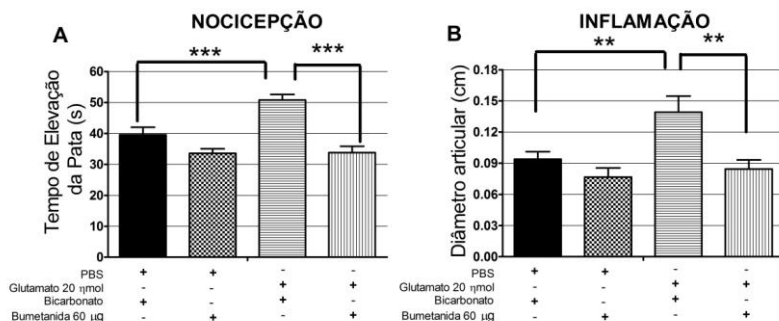


Figura 22- Efeito da administração da orexina B e do antagonista almorexant no TMNv sobre os parâmetros incapacitação (A) e diâmetro articular (B) em um modelo de dor inflamatória induzida por carragenina e LPS.

Todos os animais receberam carragenina intra-articular (300 µg; 20 µl), 72 horas antes da injeção intra-articular de LPS (3 ng/50 µl). A microinjeção no TMNv de orexina B, almorexant, orexina B + almorexant ou veículo (PBS + 0,01% DMSO) foram realizadas no TMNv 5 minutos antes do LPS intra-articular. Os tratamentos intra-TMN para esse experimento foram: orexina B (300 nM; 0,2 µl; 9 animais); almorexant (10 µM; 0,2 µl; 9 animais); orexina B + almorexant (300 nM e 10 µM respectivamente; 0,2 µl; 7 animais); Veículo (0,2 µl; 7 animais). ANOVA de uma via seguida do teste Duncan, (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$). $F(3,30) = 10,114$, $p = 0,00009$ para TEP e $F(3,30) = 6,4734$, $p = 0,00165$ para DA.

5. DISCUSSÃO

Os neurônios histaminérgicos emergem exclusivamente do TMN no hipotálamo posterior e são enviados através de projeções colaterais para praticamente todo o cérebro e medula espinhal (PANULA et al., 1984; WATANABE et al., 1984).

No presente estudo, encontramos evidências de que a histamina medular participa da modulação do processo inflamatório periférico, uma vez que a administração intratecal de um antagonista do receptor H1, cetirizina, e de um agonista do receptor H3, imemip, foram capazes de inibir a nocicepção e o edema articular periférico induzida por carragenina/LPS intra-articular. Além desses achados, também demonstramos que a ativação do TMNv com a microinjeção de glutamato potencializa a nocicepção e o edema articular periférico. Esses resultados sugerem ainda que a histamina espinhal provavelmente está envolvida não somente no processamento da nocicepção, mas também no controle da inflamação periférica.

Evidências suportam o envolvimento da histamina medular na modulação da nocicepção (SAKURADA et al., 2003; YOSHIDA et al., 2005 e STEIN et al., 2016) e da inflamação periférica (STEIN et al., 2016). O efeito antinociceptivo e pró-nociceptivo dos antagonistas H1R e do H3R, respectivamente, sugere que a histamina é liberada na medula espinhal durante a inflamação articular, e apresenta um papel no processamento da informação nociceptiva com efeitos opostos mediados por esses dois tipos de receptores.

A administração intratecal de histamina evoca comportamentos nocifencivos em camundongos (SAKURADA et al., 2003; YOSHIDA et al., 2005), bem como, potencializa a nocicepção induzida por carragenina intra-articular em ratos (STEIN et al., 2016). Além disso, foi demonstrado que camundongos *knockout* para a enzima L-histidina descarboxilase, enzima que produz a histamina, apresentam sensibilidade reduzida para estímulos dolorosos quando comparados a camundongos selvagens (YOSHIDA et al., 2005).

Muitas linhas de evidências sugerem que o efeito modulatório da histamina medular sobre a nocicepção seja mediada pelo receptor H1. A ativação do receptor H1 no corno dorsal da medula espinhal está

relacionada com um papel pró-nociceptivo em ratos e camundongos (MOBARAKEH et al., 2000; SAKURADA et al., 2003; SAKURADA et al., 2004; STEIN et al., 2016).

Além disso, a administração intratecal de antagonistas do receptor H1, pirilamina e clorfeniramina, inibiu os comportamentos nocifensivos de arranhar, morder e lamber os membros posteriores, comportamentos que são induzidos após a administração intratecal de histamina em camundongos. A administração i.t. de antagonistas do receptor H2, ranitidina e zolantidina, não alteram os efeitos sobre os comportamentos nociceptivos induzidos pela histamina (SAKURADA et al., 2003).

Corroborando essas informações, foi relatado que a injeção intratecal de antagonistas do receptor H1, ReN 1869 e cetirizina, causam analgesia em ratos (OLSEN et al., 2002; STEIN et al., 2016). Além disso, foi demonstrado que cetirizina potencializa o efeito analgésico e antiedematogênico da morfina, quando coadministradas por via intratecal em um modelo de inflamação aguda (STEIN et al., 2016).

Os camundongos *knock-out* para o receptor H1 demonstraram menor resposta aos três tipos de estímulos nociceptivos (químico, térmico e mecânico), quando comparados a camundongos selvagens, com isso sugeriu-se que a ativação do receptor H1 pode aumentar a sensibilidade a estímulos dolorosos (MOBARAKEH et al., 2000).

Acredita-se que a resposta comportamental nocifensiva induzida pela histamina seja decorrente da liberação de neurotransmissores excitatórios (glutamato, substância P e CGRP) no corno dorsal da medula espinhal, e que essa liberação é mediada pela ativação de receptores H1 presentes nos terminais centrais das fibras aferentes primárias (SAKURADA et al., 2003; WATANABE et al., 2008).

O envolvimento da substância P na transmissão medular da informação nociceptiva induzida pela histamina foi demonstrada pelo bloqueio dos receptores NK1 através da administração intratecal dos antagonistas CP-99,94 e RP-67580, além do antagonista seletivo dos receptores NK1, sendide. A administração intratecal dessas drogas inibe o comportamento nocifensivo da histamina (400 pmol/i.t) em camundongos (SAKURADA et al., 2003). Além disso, o bloqueio do

receptor NK1 em ratos *knockout* para L-histidina descarboxilase, também inibe o comportamento nocifensivo induzido pela histamina i.t (400 pmol) (YOSHIDA et al., 2005).

Sabe-se que altas doses de capsaicina causa a depleção da substância P e do glutamato dos aferentes primários (UEDA et al., 1993). De fato, o pré-tratamento com uma dose alta de capsaicina (15 nmol i.t.) aboliu a nocicepção induzida pela histamina em camundongos (800 pmol de histamina/i.t.) (MIZOGUCHI et al., 2011a) confirmando, assim, que a substância P está envolvida no comportamento nocifensivo da histamina é proveniente das fibras aferentes primárias (SAKURADA et al., 2003 e SAKURADA et al., 2004).

O envolvimento do receptor NMDA na modulação da nocicepção induzida pela histamina também foi relatado. O bloqueio medular do receptor NMDA por antagonistas como o D-APV e o CCPA, inibe a nocicepção induzida pela histamina (1600 pmol/i.t), efeito reproduzido com o bloqueio da subunidade NR1 do receptor NMDA com o uso dos antagonistas agmatina e arcaína (WATANABE et al., 2008). A subunidade NR1 é um sítio para poliaminas presente no receptor NMDA, no qual se sugere que a histamina se ligue (BROWN et al., 2001; WATANABE et al., 2008). Além disso, já foi demonstrado que a histamina aumenta a fosforilação da subunidade NR1, o que é indicativo de atividade desse receptor NMDA (MIZOGUCHI et al., 2011b).

No presente trabalho mostramos que o antagonista do receptor H1 administrado por via intratecal inibiu a nocicepção dos ratos sensibilizados com carragenina/LPS. A inibição do receptor H1 presente no neurônio aferente primário, resultaria na diminuição da sensibilização do mesmo, inibindo a liberação dos neurotransmissores excitatórios que participam da transmissão sináptica entre o neurônio aferente primário e o neurônio de segunda ordem. Logo, a transferência da informação nociceptiva para centros supramedulares estaria dificultada, conforme sugerem nos nossos experimentos pela diminuição da nocicepção.

De forma geral, o receptor H1 apresenta principalmente ação excitatória sobre os neurônios ou potencializa os *inputs* excitatórios (BROWN e HAAS 1999). A via de sinalização do receptor H1 envolve uma proteína G_{q11} , que leva a ativação da enzima fosfolipase C (PLC) (LEURS et al., 1994). A PLC por sua vez, estimula a produção do diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3), o DAG potencializa a

atividade da proteína cinase C (PKC), enquanto o IP₃ localizado no retículo endoplasmático permite a mobilização de cálcio para o citoplasma (BAKKER et al., 2002).

A literatura relata o envolvimento da via PLC-PKC na hiperalgisia térmica central causada pela ativação de receptor H₁. A administração i.c.v. de um agonista do receptor H₁, FMPH, produz hiperalgisia térmica em camundongos. Por outro lado, a inibição das vias PLC e PKC previne o surgimento da hiperalgisia térmica (GALEOTTI et al., 2004).

O envolvimento da via PLC-PKC na despolarização das fibras aferentes primárias também já foi evidenciado. Em estudos *in vitro* com cultura de células do DRG, a administração de histamina induz a despolarização e disparos dos neurônios aferentes primários. Esse efeito da histamina é mimetizado pela administração de um agonista do receptor H₁, mas não por agonistas dos receptores H₂, H₃ e H₄. Os inibidores da PLC e da PKC, inibem os efeitos da estimulação da histamina (KAJIHARA et al., 2010).

A ativação da PKC está envolvida com a regulação da sensação da dor (VELAZQUEZ et al., 2007). Além disso, a ativação da PKC sensibiliza os canais do receptor TRPV1, permeáveis ao Ca²⁺ e expressos em neurônios nociceptivos do DRG (BHAVE et al., 2003). Este efeito pode ressaltar muitas condições de dor crônica. Assim, os inibidores de PKC são atualmente uma abordagem terapêutica considerada para o tratamento de certas condições, incluindo neuropatia diabética (DAS e KING 2007).

A estimulação do receptor H₁ pode potencializar de forma indireta a formação de AMPc através de substâncias que atuam nos receptores acoplados à proteína G_s, como por exemplo, a própria histamina agindo em sinergismo com o receptor H₂ ou adenosina atuando no receptor A₂ (BAUDRY et al., 1975; DAUM et al., 1982 e LEURS et al., 1994).

Já foi demonstrado que um dos mecanismos pelo qual o receptor H₁ exerce seus efeitos no SNC, está relacionado com a ativação da via AC/AMPc/PKA (MONIRI e BOOTH, 2006; SELBACH et al., 1997), e a liberação de cálcio do retículo endoplasmático via IP₃ (Hill et al., 1997), vias que também podem evocar ou promover o LTP – *long*

term potentiation (BROWN et al., 1995; SELBACH et al., 1997; BROWN et al., 2001), evento este que está relacionado com a sensibilização do nociceptor aferente primário em ratos (TAIWO e LEVINE, 1991; SACHS et al., 2009). Assim, a via de sinalização molecular do receptor H1 medular se adapta bem à ideia da sensibilização dos aferentes primários.

Constatamos neste trabalho que o bloqueio espinal do receptor H3 com o antagonista tioperamida desencadeou o aumento tanto da incapacitação, quanto do edema articular, sugerindo que a papel medular exercido por esse receptor é responsável pela diminuição da nocicepção e da inflamação periférica. Ao administrar o agonista do receptor H3 intratecal, o immepip, obtivemos a diminuição da incapacitação articular e do edema periférico, reforçando assim a ideia da função inibitória desse receptor na nocicepção.

Corroborando esses achados, Cannon (2003) demonstrou que a administração de immepip por via intratecal causa analgesia mecânica no teste de pinça da cauda.

A possível explicação para esse efeito modulatório do receptor H3, é a sua localização no terminal medular dos neurônios histaminérgicos. O receptor H3 é o único dos receptores para histamina que está expresso nos neurônios histaminérgicos, sendo localizado no corpo dos neurônios e no seu axônio terminal (ARRANG *et al.*, 1983; ITOH et al., 1991; PRAST et al. 1994). O receptor H3 é um autoreceptor inibitório e exerce o controle sobre a síntese e a liberação de histamina (ARRANG et al., 1985), então a sua ativação inibe a liberação de histamina.

Esses receptores possuem sua via de transdução acoplada a uma proteína G (i/o) que ao ser ativada inibe a atividade da adenilato ciclase (AC), diminuindo a síntese e liberação de histamina do terminal sináptico por inibição de proteínas quinase dependentes do AMPc (GOMEZ RAMIREZ et al., 2002; TORRENT et al., 2005).

Além disso, a ativação do receptor H3 suprime a ativação de canais de cálcio ativados por voltagem no neurônio histaminérgico, o que explica a inibição da liberação de histamina e a inibição dos disparos espontâneos (ARRANG et al., 1985; STEVENS e HAAS, 1996; STEVENS et al., 2001; TAKESHITA et al., 1998).

O tratamento dos neurônios do TMV *in vitro* com o antagonista do receptor H3 tioperamida evoca um aumento na taxa de disparos desses neurônios, enquanto que a administração da própria histamina reduz a frequência dos disparos dos neurônios histaminérgicos (STEVENS et al., 2001).

O efeito inibitório na liberação de histamina pode ser eliminado quando a concentração de Ca^{2+} extracelular é aumentada (ARRANG et al., 1985). Os canais de cálcio dependentes de voltagem dos neurônios histaminérgicos são suprimidos por histamina, este efeito inibitório é completamente bloqueado pelo antagonista competitivo do receptor H3 tioperamida e pode ser mimetizado pelo agonista R- α -metilhistamina, demonstrando assim que o receptor H3 restringe a corrente de cálcio, que é essencial para a liberação de histamina (ARRANG et al., 1985; TAKESHITA et al., 1998).

A presença do receptor H3 na fibra aferente primária, assim como em neurônios da medula espinhal já foi relatada (POLARD et al., 1993; HÉRON et al., 2001; MEDHURST et al., 2008) e comprovada com testes imunohistoquímicos (CANNON et al., 2007b). A ativação desse receptor no terminal periférico da fibra aferente primária é capaz de liberar peptídeos inflamatórios na pele, como substância P e CGRP (FUNDIN et al., 1997; CANNON et al., 2007b; BOWSHER et al., 2009). Porém, a habilidade do receptor H3 presente no terminal central da fibra aferente primária alterar a liberação de peptídeos na periferia não foi confirmada (CANNON et al., 2007b), o que fortalece nossa hipótese que o agonista immepip e o antagonista tioperamida, estão atuando via receptores H3 presentes nas fibras histaminérgicas medulares.

Assim, acreditamos que a administração intratecal do agonista H3 esteja ativando receptores H3 presentes no terminal medular dos neurônios histaminérgicos e, conseqüentemente, inibindo a liberação de histamina na medula, o que resultou em um efeito antinociceptivo e anti-inflamatório. De forma contrária, com o bloqueio do receptor H3 medular com a administração do antagonista, pode haver um favorecimento da liberação de histamina o que culmina com os efeitos pró-nociceptivos e pró-inflamatórios observados no presente trabalho.

Também demonstramos que a microinjeção de glutamato no TMNv potencializou o processo nociceptivo e edematogênico induzido pela carragenina/LPS. Acreditamos que a excitação dos neurônios

histaminérgicos pode estar aumentando a liberação de histamina na medula espinhal o que contribui com o aumento dos parâmetros inflamatórios observados neste trabalho.

A atividade dos neurônios histaminérgicos é regulada por neurônios excitatórios glutamatérgicos, fibras glutamatérgicas provenientes de regiões do córtex e do próprio hipotálamo excitam os neurônios do TMN (YANG e HATTON, 1997). Os receptores AMPA e NMDA possuem um papel vital na regulação da atividade histaminérgica, pois juntos esses receptores medeiam ativação direta do sistema histaminérgico (SCHOEPP, 2001; FELL et al., 2015).

A estimulação elétrica de áreas hipotalâmicas e da região pré-optica lateral pode evocar excitação glutamatérgica nos neurônios do TMN (YANG e HATTON, 1997). Além disso, a infusão por microdialise de glutamato ou de NMDA no hipotálamo anterior resulta em um aumento na liberação de histamina nesse núcleo que pode ser bloqueado pelo antagonista de NMDA, o AP5 (OKAKURA et al., 1992). Recentemente foi demonstrado que a infusão de NMDA no TMN aumenta a liberação de histamina no córtex pré-frontal (FELL et al., 2015).

Outras evidências sugerem que a interação entre o sistema histaminérgico e glutamatérgico depende do estado de atividade dos animais. No estado de baixa atividade (fase clara do ciclo claro-escuro), o nível histaminérgico basal é baixo e pode ser mais facilmente aumentado do que diminuído, através da modulação do receptor NMDA. Em contrapartida, no estado de alta atividade (fase escura), o nível histaminérgico basal dos ratos é elevado e assim pode ser diminuído, em vez de aumentado (Fell et al., 2015). Nossos experimentos foram executados na fase clara, fase de baixa atividade dos animais e nível basal de histamina baixo, sendo assim, o trabalho de Fell e colaboradores (2015) fortalece nossa hipótese de que a administração do glutamato no TMNv favoreça o aumento da liberação de histamina.

No nosso trabalho também demonstramos que a micro-injeção no TMNv de um inibidor da transmissão sináptica, o cloreto de cobalto, diminuiu a incapacitação e o edema inflamatório periférico.

A forma mais eficiente de inibir a liberação da histamina neuronal é a inibição da sua síntese. A taxa de síntese da histamina é

controlada pela biodisponibilidade do seu precursor, histidina, e pela atividade da enzima que converte a histidina em histamina, a L-histidina descarboxilase (HAAS et al., 2008). Assim a ferramenta farmacológica mais apropriada para a inibição da síntese da histamina é o inibidor da enzima L-histidina descarboxilase, o α -fluoromethylhistidine - α -FMH, (KOLLONITSCH et al., 1978), porém esse composto apresenta uma síntese complexa e, atualmente, sua comercialização é inviável. Por esses motivos, optamos pelo cloreto de cobalto.

O cloreto de cobalto é eficaz em inibir de forma reversível o potencial de ação dos neurônios histaminérgicos (HAAS e REINER 1988; STEVENS e HAAS, 1996), por reduzir o influxo pré-sináptico de cálcio, causando uma inibição transitória da liberação de neurotransmissores, sem alterar as fibras de passagem (KRETZ, 1984). Por isso, acreditamos que a micro-injeção de cloreto de cobalto no TMNv provavelmente está diminuindo a liberação de histamina na medula espinhal, o que contribui para a inibição da incapacitação e do edema periférico no presente trabalho.

Dessa forma, podemos concluir que a manipulação farmacológica do TMNv interferiu no processamento nociceptivo e na inflamação periférica. Conforme visto anteriormente, a ativação do TMN culmina na liberação de histamina no SNC (FELL et al., 2015). Por isso, acreditamos que a administração de glutamato no TMN aumenta a liberação de histamina na medula, e como resultado dessa liberação, temos a potencialização da dor e da inflamação periférica, como observado nos experimentos com glutamato intra-TMN. Além disso, nossos resultados também demonstraram o envolvimento do receptor H1 medular na modulação da nocicepção e da inflamação periférica quando, com o bloqueio desse receptor, revertermos o efeito da estimulação intra-TMNv sobre a nocicepção e a inflamação periférica.

Em relação à investigação dos efeitos da orexina, nossos resultados indicaram que microinjeção de orexina B no TMNv potencializou a nocicepção e a inflamação periférica e o bloqueio dos receptores de orexina no TMNv reverteu a ação excitatória da orexina B sobre os neurônios histaminérgicos.

Já foi relatado que o TMN recebe densas projeções de neurônios do hipotálamo lateral (BAYER et al., 2001). O padrão de inervação no TMN por neurônios orexinérgicos é de natureza excitatória (ERIKSSON

et al., 2001) e esse efeito excitatório é mediado por receptores OX2 (MARCUS et al., 2001; YAMANAKA et al., 2002; MIEDA et al., 2011).

Iamanaka e colaboradores (2002) demonstraram que a administração das orexinas A e B no TMN aumenta a taxa de disparos dos neurônios histaminérgicos. Além disso, também foi demonstrado que a perfusão de orexina no TMN leva ao aumento da liberação de histamina em diversas regiões do SNC (HUANG et al., 2001; ISHIZUKA et al., 2002). Sabe-se que as orexinas atuam pós-sinápticamente através da ativação do trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que aumenta a concentração de Ca^{2+} citosólico e corrente de Ca^{2+} (VAN DEN POL et al., 1998; HORVATH et al., 1999b; ERIKSSON et al., 2001), eventos que estão envolvidos na excitação dos neurônios histaminérgicos e, consequentemente, na liberação de histamina (ARRANG et al., 1985).

Dessa forma, levando em consideração que as orexinas desempenham um papel importante na ativação dos neurônios histaminérgicos, acreditamos que os efeitos hipernociceptivos e pró-edematogênicos observados com a microinjeção de orexina B no TMNv foi, provavelmente, decorrente da ativação desses neurônios e, consequentemente, do aumento da liberação de histamina na medula espinhal.

No presente trabalho, a administração isolada do antagonista do receptor OX2 no TMNv, almorexant, não alterou o processo de nocicepção e inflamação periférica induzida pela carragenina/LPS. Porém preveniu o efeito estimulatório da orexina sobre os neurônios histaminérgicos.

Sabe-se que os antagonistas dos receptores OX1 e OX2 são capazes de bloquear o efeito excitatório das orexinas (BRISBARE-ROCH et al., 2007). Em um estudo recente, mesmo com a administração do almorexant (100 mg/kg), os neurônios histaminérgicos apresentaram alta expressão de c-Fos, um indicativo de atividade desses neurônios. Esse estudo sugere que o bloqueio do receptor OX2 no TMN inibe apenas a excitabilidade causada pelas orexinas, mas não causa inibição dos neurônios histaminérgicos (PARKS et al., 2015), o que corrobora nossos resultados, já que somente a inibição do receptor OX2 não foi suficiente para alterar o fenômeno nociceptivo e inflamatório induzido pela carragenina/LPS.

Um dos achados de grande relevância neste trabalho foi a modulação da inflamação periférica através da injeção intratecal de histamina. Uma possível explicação para o aumento do edema inflamatório periférico é a deflagração do reflexo da raiz dorsal nos terminais centrais das fibras aferentes primárias.

A medula espinhal é conhecida por ser um centro que controla, não só a nocicepção, mas também a inflamação periférica. Isso ocorre pela capacidade dos neurônios do corno dorsal da medula espinhal alterar a atividade antidrômica nos nociceptores aferentes primários (WILLIS et al., 1999). No presente trabalho, a histamina parece desempenhar não apenas um papel na modulação da nocicepção, mas também na modulação da inflamação periférica, uma vez que tanto o antagonista do receptor H1 cetirizina, quanto o agonista do receptor H3 immpip, foram eficazes em reduzir o edema articular. Esses achados estão de acordo com resultados prévios do nosso laboratório, que demonstraram que a manipulação do receptor H3 medular apresenta efeitos antiinflamatórios no modelo inflamatório agudo da carragenina (STEIN, et al., 2016).

Durante a inflamação articular, as fibras aferentes primárias tornam-se mais excitáveis do que em condições normais frente a estímulos tanto inócuos quanto nociceptivos (SLUKA et al., 1994; REES et al., 1995). Existem importantes evidências que demonstram que a atividade persistente ou intensa no nociceptor periférico leva a um aumento na responsividade dos neurônios do corno dorsal (COOK et al., 1989; HYLDEN et al., 1989; LAIRD e CERVERO 1989). Isso ocorre porque a inflamação causa sensibilização periférica, a qual é caracterizada por uma redução no limiar de ativação das fibras aferentes primárias que inervam a articulação. Esse *input* nociceptivo aumentado pela inflamação articular periférica causa sensibilização central, ou seja, um aumento da excitabilidade dos neurônios da medula espinhal (WOOLF, 1994; SCHAIBLE et al., 1987; NEUGEBAUER e SCHAIBLE, 1990). Já está bem definido, que uma das consequências da despolarização excessiva dos terminais centrais das fibras aferentes primárias, sob condições patológicas, é a facilitação do reflexo da raiz dorsal (WILLIS, 1999).

Esse reflexo de origem medular potencia a inflamação ao causar a liberação de peptídeos vasoativos, principalmente a SP, o peptídeo relacionado ao gene calcitonina (CGRP) e, possivelmente, a prostaglandina E 2 (SLUKA et al., 1995 a; SLUKA et al., 1995 b;

AVERBECK et al., 2001) do nociceptor no tecido periférico, cujo resultado é a inflamação neurogênica (WILLIS, 1999).

No presente trabalho, evidenciamos o envolvimento do RRD na manutenção da inflamação periférica induzido por carragenina/LPS quando realizamos o bloqueio farmacológico medular do cotransportador NKCC1 através da administração i.t. da bumetanida, que como consequência diminuiu a inflamação periférica.

O RRD é um fenômeno dependente do gradiente de concentração de íons cloreto, a concentração do íon cloreto é mantida elevada no aferente primário devido à presença dos cotransportadores NKCC1 (WILLIS, 1999). O RRD ocorre a partir das lâminas superficiais do corno dorsal (CHABWINE et al. 2009; WILLIS, 1999), local onde os transportadores de Cl^- (NKCC1) são identificados nos neurônios sensoriais de ratos (MORALES-AZA et al., 2004). O bloqueio espinhal do NKCC1, de forma dependente de dose, reduz a atividade do RRD, a inflamação neurogênica, a alodinia mecânica e a hiperalgesia secundária, quando o bloqueador é administrado antes da capsaicina (VALENCIA-DE ITA, 2006).

No presente trabalho, mais especificamente no experimento com ativação do TMNv, o bloqueio do NKCC1 reverteu não só o edema periférico, mas também a incapacitação articular, o que sugere que o efeito sobre a nocicepção, neste caso, pode ser secundário ao efeito sobre o processo inflamatório.

Estudos demonstram que o aumento na sensibilização dos neurônios no corno dorsal da medula espinhal é crítico para a geração de potenciais de ação nos terminais centrais das fibras aferentes primárias (WILLIS, 1999). Desta forma, acreditamos que a liberação de histamina na medula espinhal, está favorecendo um aumento da excitabilidade dos neurônios medulares (via ativação do receptor H1), que ao somar-se à despolarização excessiva das fibras aferentes primárias (devido o processo inflamatório periférico), leva à facilitação da deflagração do RRD, com potencialização do quadro inflamatório periférico.

De fato, quando administramos na medula espinhal a histamina concomitante ao bloqueador dos cotransportadores NKCC1, obtivemos uma diminuição da potencialização do edema articular induzido pelo LPS intra-articular. Esse resultado fortalece nossa hipótese do envolvimento

do RRD no efeito pró-edematogênico da histamina medula. Além disso, nesse experimento conseguimos demonstrar que os mecanismos envolvidos na nocicepção e na inflamação possivelmente não são os mesmos, uma vez que a administração do bloqueador do NKCC1 só bloqueou o edema articular e não afetou a incapacitação.

Estudos eletrofisiológicos demonstraram um efeito excitatório da histamina via receptor H1. A ativação do receptor H1 em muitos neurônios leva à despolarização e ao aumento da frequência de disparo desses neurônios (HAAS, 1992). Como relatado anteriormente, a ativação de H1 na fibra aferente primária leva à liberação de SP e glutamato no corno dorsal da medula espinhal (SAKURADA et al., 2003; SAKURADA et al., 2004; WATANABE et al., 2005), o que acreditamos que pode estar contribuindo com a sensibilização central, facilitando o RRD. Essa hipótese se torna mais consistente quando analisamos o papel fisiológico dos receptores H3 (autoreceptores inibitórios), cuja ativação leva a inibição da liberação de histamina dos neurônios histaminérgicos (BROWN e HAAS, 1999). O agonista desse receptor causou a diminuição do edema articular periférico. Assim, os efeitos opostos observados no processo inflamatório periférico com ativação dos receptores H1 e H3 são consistentes com a teoria de sensibilização neural, e a facilitação do RRD.

Outros dados da literatura relatam que a sensibilização dos aferentes primários aumenta a expressão do cotransportador NKCC1 (GALAN e CERVERO, 2005; PITCHER e CERVERO, 2010), que está presente no corno dorsal da medula espinhal e no gânglio trigeminal (regiões relacionadas com o processamento da dor) e sua expressão está aumentada após estímulos nociceptivos intensos e persistentes como, por exemplo, nas artrites (MORALES-AZA et al., 2004; GALAN et al., 2005; PRINCE et al., 2006). Já foi demonstrado com eletrofisiologia *in vivo* que a sensibilização dos neurônios nociceptivos medulares é em parte devido o aumento da atividade do NKCC1 (PITCHER et al., 2010) e os bloqueios genético e farmacológicos do NKCC1 atenuam os comportamentos relacionados à dor em roedores (CRAMER et al., 2008; LAIRD et al., 2004; GRANADOS-SOTO et al., 2005; VALENCIA-DE ITA et al., 2006).

Reunindo todas as evidências aqui apresentadas, acreditamos que a liberação de histamina na medula espinhal devido à ativação do TMN, atue via receptor H1, aumentando a sensibilização dos neurônios espinhais, facilitando assim a deflagração do RRD. Dessa forma, o RRD

seria o responsável pela potencialização da nocicepção e do processo inflamatório articular.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- No presente trabalho demonstramos que a ativação histaminérgica central contribui para a nocicepção e a inflamação periférica, pois a inibição da atividade dos neurônios histaminérgicos diminuiu ambos processos;
- A administração exógena de histamina na medula espinhal pode causar aumento da nocicepção e inflamação periférica, isto indica que a histamina endógena, provavelmente por atuar sobre os receptores H1 da medula espinhal, apresenta efeitos hipernociceptivos e pró-inflamatórios. Ao contrário, a histamina endógena atuando sobre os autoreceptores H3 espinhais apresenta efeitos hiponociceptivos e anti-inflamatórios;
- O efeito pró-inflamatório exercido pela histamina liberada na medula espinhal é resultante provavelmente do aumento da deflagração do reflexo da raiz dorsal;
- A orexina excita neurônios histaminérgicos o que aumenta a nocicepção e a inflamação periférica. O antagonista não seletivo almorexant bloqueia a ação da orexina, mas não inibe neurônios histaminérgicos;
- Nossos resultados também deixam margem para sugerir que a medula espinhal pode ser um possível alvo terapêutico para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas como a artrite.

As figuras 23 e 24 esquematizam a interação entre da histamina liberada pelos neurônios histaminérgicos e o receptor H1 na medula espinhal e como esta interação contribui para a inflamação articular, como encontrado em nossos experimentos.

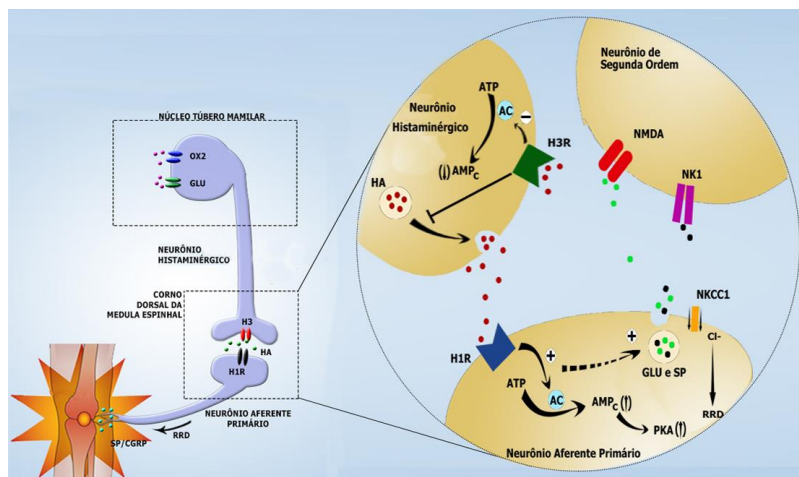


Figura 23- Interação entre o neurônio histaminérgico, a fibra aferente primária e o neurônio de 2ª ordem na transmissão da informação nociceptiva e inflamatória no modelo da artrite reativa.

Ativação do núcleo tuberomamilar (pelo glutamato ou orexina) culmina na liberação de histamina no corno dorsal da medula espinhal, essa histamina interage com o receptor H1 no neurônio aferente primário o que pode gerar sensibilização desse aferente primário, com consequente liberação de glutamato e substância P, esses aminoácidos excitatórios se ligam aos seus receptores no neurônio de 2ª ordem, conduzindo a informação nociceptiva até centros supramedulares, como o tálamo. A sensibilização do aferente primário contribui ainda para o aumento da expressão do cotransportador NKCC1, o que leva ao aumento da concentração intracelular do íon Cl^- , o que facilita a deflagração do RRD com a liberação no tecido periférico de mediadores pró-inflamatórios (SP e CGRP), contribuindo assim, para a potencialização da inflamação periférica. OX2 receptor para orexina do tipo 2; GLU – receptor para glutamato; RRD – reflexo da raiz dorsal; SP – substância P; CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina. Fonte: autoria própria.

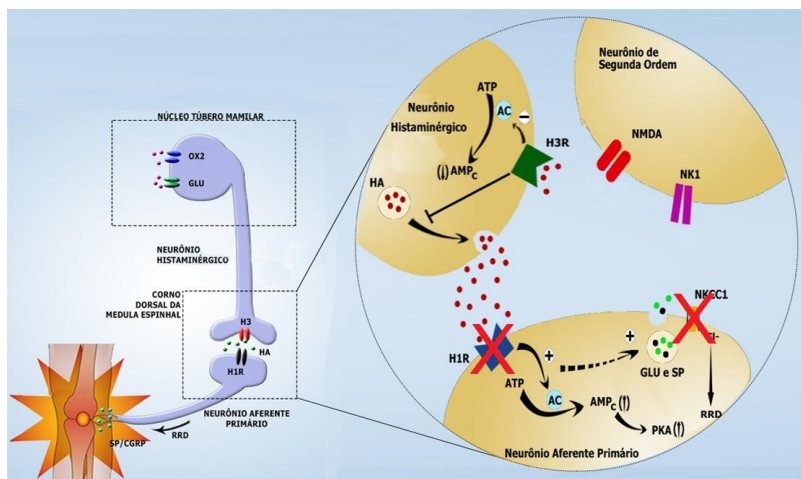


Figura 24- Interação entre o neurônio histaminérgico, a fibra aferente primária e o neurônio de 2ª ordem na transmissão da informação nociceptiva e inflamatória no modelo da artrite reativa – Bloqueio do receptor H1 e do cotransportador NKCC1.

O bloqueio do receptor H1 presente no aferente primário, com a administração intratecal do antagonista cetirizina, impede que ocorra a sensibilização desse neurônio com consequente inibição da liberação dos aminoácidos excitatórios e diminuição da transmissão da informação nociceptiva para centros supramedulares. Além disso, sem sensibilização periférica e central a expressão do cotransportador NKCC1 está normal, assim a concentração intracelular do íon Cl^- também está normal, o que dificulta a deflagração do RRD e culmina com a diminuição da dor e da inflamação periférica. A administração na medula espinhal do bloqueador do cotransportador NKCC1, bumetanida, impede o aumento da concentração intracelular do íon Cl^- , o que dificulta a deflagração do RRD e contribui para a diminuição da dor e da inflamação periférica. OX2 receptor para orexina do tipo 2; GLU – receptor para glutamato; RRD – reflexo da raiz dorsal; SP – substância P; CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina. Fonte: autoria própria.

7. REFERÊNCIAS

ABRAHAMSON, E.E.; LEAK, R.K.; MOORE, R.Y. The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems. *Neuroreport*, v. 12, p. 435–440, 2001.

ADAM, H.M.; HYE, H.K.A. Concentration of histamine in different parts of brain and hypophysis of cat and its modification by drugs. *Br. J. Pharmacol*, v. 28, p. 137-152, 1966.

ALEY, K.O.; LEVINE, J.D. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. *J Neurosci*, v. 19: p. 2181–2186, 1999.

ALVAREZ-LEEFMANS, F.J.; LEON-OLEA, M.; MENDOZA-SOTELO, J.; ALVAREZ, F.J.; ANTON, B.; GARDUNO, R. Immunolocalization of the Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter in peripheral nervous tissue of vertebrates. *Neuroscience*, v. 104, n. 2, p. 569–582, 2001.

ALVAREZ-LEEFMANS, FJ.; GAMINO, SM.; GIRALDEZ, F.; NOGUERON, I. Intracellular chloride regulation in amphibian dorsal root ganglion neurones studies with ion selective microelectrodes. *J. Physiol*, v. 406, p. 225-46, 1988.

ARRANG, J.M.; GARBARG M, LANCELOT JC, LECOMTE JM, POLLARD H, ROBBA M, SCHUNACK W, SCHWARTZ JC (). Highly potent and selective ligands for histamine H3-receptors. *Nature*, v. 327, p. 117–123, 1987

ARRANG, J.M.; GARBARG, M.; SCHWARTZ, J.C. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. *Nature*, v. 302, p. 832–837, 1983.

ARRANG, J.M.; ROY, J.; MORGAT, J.L.; SCHUNACK, W.; SCHWARTZ, J.C. Histamine H3 receptor binding sites in rat brain membranes: modulations by guanine nucleotides and divalent cations. *Eur. J. Pharmacol.* v. 188, p. 219-227, 1990.

ARRANG, J.M.; GARBARG, M.; SCHWARTZ, J.C. Autoregulation of histamine release in brain by presynaptic H3-receptors. *Neuroscience*, v. 2, p. 553-62, 1985.

AVERBECK, B.; REEH, P.W.; MICHAELIS, M. Modulation of CGRP and PGE2 release from isolated rat skin by alpha-adrenoceptors and kappa- opioid-receptors. *Neuroreport*, v. 12, n. 10, p. 2097– 2100, 2001.

AZHDARI-ZARMEHRI, A.; REISIC, Z.; VAZIRIC, A.; HAGHPARASTC, A.; SHAIGANIC, P.; HAGHPARASTC, A. Involvement of orexin-2 receptors in the ventral tegmental area and nucleus accumbens in the antinociception induced by the lateral hypothalamus stimulation in rats. *Peptides*, v. 47, p. 94–98, 2013.

AZHDARI-ZARMEHRI, H.; SEMNANIAN, S.; FATHOLLAHI, Y. Orexin-A microinjection into the rostral ventromedial medulla causes antinociception on formalin test. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 122, p. 286–290, 2014.

AZHDARI-ZARMEHRI, H.; SEMNANIAN, S.; FATHOLLAHI, Y.; ERAMI, E.; KHAKPAY, R.; AZIZI, H.; ROHAMPOUR, K. Intra-periaqueductal gray matter microinjection of orexin-A decreases formalin-induced nociceptive behaviors in adult male rats. *J Pain*, v. 12, p. 280-287, 2011.

BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, v. 139, p. 267-284, 2009.

BATTAGLIA, G.; RUSTIONI, A. Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. *J Comp Neurol*, v. 277, p. 302–312, 1988.

BAUDRY, M.; MARTRES, M.P.; SCHWARTZ, J.C; H1 and H2 receptors in the histamine-induced accumulation of cyclic AMP in guinea pig brain slices. *Nature*, v. 253, p. 362–364, 1975.

BAYER, L.; EGGERMANN, E.; SERAFIN, M.; SAINT-MLEUX, B.; MACHARD, D.; JONES, B.; MÜHLETHALER, M. Orexins (hypocretins) directly excite tuberomammillary neurons. *Eur J Neurosci*, v. 14, p. 1571–1575, 2001.

BAYLISS, W.M. On the origin from the spinal cord of the vasodilator fibres of the hind-limb, and on the nature of these fibres. *J Physiol*, v. 26, p. 173-209, 1901.

BEE, L. A.; DICKENSON, A. H. Rostral ventromedial medulla control of spinal sensory processing in normal and pathophysiological states. *Neuroscience*, v. 147, p. 786-793, 2007.

BEECHER, H.K. Generalization from pain of various types and diverse origins. *Science*, v. 31, p. 267-268, 1959.

BERNARD J.F.; ALDEN, M.; BESSON, J.M. The organization of the efferent projection from the pontine parabrachial area to the amygdaloid complex: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) study in the rat. *J Comp Neurol*, v. 329, p. 201-229, 1993.

BERNARD, J.F.; BESTER H.; BESSON J.M. Involvement of the spino-parabrachio-amygdaloid and -hypothalamic pathways in the autonomic and affective emotional aspects of pain G. CHAPTER 14. HOLSTEGE, R.; BANDLER. C.B. Saper (Eds.) Prog Brain Res, v. 107. Elsevier Science B.V. p. 243-155, 1996.

BESTER, H.; MENENDEZ, L.; BESSON, J.M; BERNARD, J.F. The spino(trigemino)parabrachiohypothalamic pathways: electrophysiological evidence for an involvement in pain processes. *J Neurophysiol*, v. 73, p. 568-585, 1995.

BHAVE, G.; HU, H.J.; GLAUNER, K.S.; ZHU, W.; WANG, H.; BRASIER, D.J.; OXFORD, G.S.; GEREAU, R.W. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 100, p. 12480-12485, 2003.

BINGHAM, S.; DAVEY, P.T.; BABBS, A.J.; IRVING, E.A.; SAMMONS, M.J.; WYLES, M.; JEFFREY, P.; CUTLER, L.; RIBA, I.; JOHNS, A.; PORTER, R.A.; UPTON, N.; HUNTER, A.J.; PARSONS, A.A. Orexin-A, an hypothalamic peptide with analgesic properties. *Pain*, 92, 81–90, 2001.

BLAESSE, P.; AIRAKSINEN, M.S.; RIVERA, C.; KAILA, K. Cation-Chloride Cotransporters and neuronal function. *Neuron*, v. 61, p. 820–838, 2009.

BLOUIN, A.M.; FRIED, I.; WILSON, C.L.; STABA, R.J.; BEHNKE. E.J.; LAM, HA.; MAIDMENT, N.T.; KARLSSON, K.E.; LAPIERRE, J.L.; SIEGEL, J.M. Human hypocretin and melanin-

concentrating hormone levels are linked to emotion and social interaction. *Nat Commun*, v. 4, p. 154-157, 2013.

BOWSHER, D.; GEOFFREY WOODS, C.; NICHOLAS, A.K.; CARVALHO, O.M.; HAGGETT, C.E.; TEDMAN, B.; MACKENZIE, J.M.; CROOKS, D., MAHMOOD, N., TWOMEY, J.A.; et al. Absence of pain with hyperhidrosis: a new syndrome where vascular afferents may mediate cutaneous sensation. *Pain*, v. 147 p. 287–298, 2009.

BRESSAN, E.; TONUSSI, C.R. Antiinflammatory effects of etoricoxib alone and combined with NSAIDs in LPS-induced reactive arthritis. *Inflamm Res*, v. 57, p. 586-592, 2008.

BRISBARE-ROCH, C.; DINGEMANSE, J.; KOBERSTEIN, R.; HOEVER, P.; AISSAOUI, H.; FLORES, S.; MUELLER, C.; NAYLER, O.; VAN GERVEN, J.; HAAS, S.L.; HESS, P.; QIU, C.B.; BUCHMANN, S.; SCHERZ, M.; WELLER, T.; FISCHLI, W.; CLOZEL, M.; JENCK F. Promotion of sleep by targeting the orexin system in rats, dogs and humans *Nat Med*, v. 13. p. 150–155, 2007.

BROWN, R.E.; FEDOROV, N.B.; HAAS, H.L.; REYMANN, K.G. Histaminergic modulation of synaptic plasticity in area CA1 of rat hippocampal slices. *Neuropharmacology*, v. 34, p.181–190, 1995.

BROWN, R.E.; STEVENS, D.R.; HAAS, H.L. The physiology of brain histamine. *Prog Neurobiol*, v. 63, p. 637–672, 2001.

BROWN, RE.; HAAS, HL. On the mechanism of histaminergic inhibition of glutamate release in the rat dentate gyrus. *J Physiol*, v. 515, p. 777–783 1999.

BUCKLAND, K.F.; WILLIAMS, T.J.; CONROY, D.M. Histamine induces cytoskeletal changes in human eosinophils via the H4 receptor. *Br J Pharmacol*; v. 140, p. 1117–1127; 2003.

CANNON, K.E.; CHAZOT, P.L.; HANN, V.; SHENTON, F.; HOUGH, L.B.; RICE, F.L. Immunohistochemical localization of histamine H3 receptors in rodent skin, dorsal root ganglia, superior cervical ganglia, and spinal cord: potential antinociceptive targets. *Pain*, v. 129, p. 76–92, 2007b.

CANNON, K.E.; LEURS, R.; HOUGH, L.B. Activation of peripheral and spinal histamine H3 receptors inhibits formalin-induced inflammation and nociception, respectively. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 88, p. 122–129, 2007a.

CERVERO, F. Sensory innervation of the viscera: peripheral basis of visceral pain. *Physiol Rev*, v. 74, p. 95–138, 1994.

CERVERO, F.; LAIRD, J.M. Mechanisms of allodynia: interactions between sensitive mechanoreceptors and nociceptors. *Neuroreport*, v. 7, p. 526–528, 1996.

CERVERO, F.; LAIRD, J.M. Mechanisms of touch-evoked pain (allodynia): a new model. *Pain*, v. 68, 13–23, 1996.

CERVERO, F.; LAIRD, J.M.; GARCIA-NICAS, E. Secondary hyperalgesia and presynaptic inhibition: an update. *Eur J Pain*, v. 7, p. 345–351. 2003.

CHEMELLI, R.M.; WILLIE, J.T.; SINTON, C.M.; ELMQUIST, J.K.; SCAMMELL, T.; LEE, C.; RICHARDSON, J.A.; WILLIAMS, S.C.; XIONG, Y.; KISANUKI, Y.; FITCH, T.E.; NAKAZATO, M.; HAMMER, R.E.; SAPER, C.B.; YANAGISAWA, M. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell*, v. 98, p. 437–451, 1999.

CHEN, C.T.; DUN, S.L.; KWOK, E.H.; DUN, N.J.; CHANG, J.K. Orexin A-like immunoreactivity in the rat brain. *Neurosci Lett*, v. 260, 161–164, 1999

COLPAERT, F. C.; DONNERER, J.; LEMBECK, F. Effects of capsaicin on inflammation and on the substance P content of nervous tissues in rats with adjuvant arthritis. *Life Sci*, v. 32, p. 1827–1834, 1983.

COOK, A.J; WOOLF, C.J.; WALL, P.D.; MCMAHON, S.B. Dynamic receptive field plasticity in rat spinal cord dorsal horn following C primary afferent input. *Nature*, v. 325, p. 151–153, 1987.

COSTIGAN, M.; BEFORT, K.; KARCHEWSKI, L.; GRIFFIN, R.S.; D'URSO, D.; ALLCHORNE, A.; SITARSKI, J.; MANNION, J.W.; PRATT, R.E.; WOOLF, C.J. Replicate high-density rat genome oligonucleotide microarrays reveal hundreds of regulated

genes in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury. *BMC Neurosci* v. 3, p.16, 2002

COULL, J.A.; BEGGS, S.; BOUDREAU, D.; BOIVIN, D.; TSUDA, M.; INOUE, K.; GRAVEL, C.; SALTER, M.W.; DE KONINCK, Y. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*, v. 438, p. 1017-1021, 2005.

CRAMER, S.W.; BAGGOTT, C.; CAIN, J.; TILGHMAN, J.; ALLCOCK, B.; MIRANPURI, G.; RAJPAL, S.; SUN, D.; RESNICK, D. The role of cation-dependent chloride transporters in neuropathic pain following spinal cord injury. *Mol Pain*, v.4, p. 1-8, 2008.

CUELLO, A. C. et al. Organization of substance P primary sensory neurons: ultrastructural and physiological correlates. *Regulatory peptides*, v. 46, p. 155–164, 1993.

DAFNY, N.; DONG, W.Q.; PRIETO-GOMEZ, C.; REYES-VAZQUEZ, J.; STANFORD, J.; QUIAO, J.T. Lateral hypothalamus: site involved in pain modulation. *Neuroscience*, v. 70, p. 449-460, 1996.

DAS EVCIMEN, N.; KING G.L. The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacol Res*, v. 55, p. 498-510, 2007.

DAUM, P.R.; HILL, S.J.; YOUNG, J.M. Histamine H1-agonist potentiation of adenosine-stimulated cyclic AMP accumulation in slices of guinea-pig cerebral cortex: comparison of response and binding parameters. *Br J Pharmacol*, v. 77, p. 347–357, 1982.

DAVID, R.; HELMUT, S.; HAAS, L. Calcium-dependent prepotentials contribute to spontaneous activity in rat tuberomammillary neurons. *J Physiology*, v. 493.3, p.747-754, 1996.

DE CAMILLI, P.; JAHN, R. Pathways to regulated exocytosis in neurons. *Ann Rev Physiol*, v. 52, p. 625–645, 1990.

DE FELIPE, C. HERRERO, J.F.; O'BRIEN, J.A.; PALMER, J.A.; DOYLE, C.A.; SMITH, A.J.; LAIRD, J.M.; BELMONTE, C.; CERVERO, F.; HUNT, S.P. Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. *Nature*, v. 392, p. 394–397, 1998.

DE GROAT, WC.; LALLEY, PM.; SAUM, WR. Depolarization of dorsal root ganglia in the cat by GABA and related amino acids: antagonism by picrotoxin and bicuculline. *Brain Res*, v. 44, p. 273-277, 1972.

DIJKSTRA D.; LERS R.; CHAZOT P.; SHENTON FC.; STARK H.; WERFEL T.; GUTZMER R. Histamine downregulates monocyte CCL2 production through the histamine H4 receptor. *J Allergy Clin Immunol*, v. 120, p. 300-307, 2007.

DMITRIEVA, N.; MCMAHON, S. B. Sensitization of visceral afferents by nerve growth factor in the adult rat. *Pain*, v. 66, p. 87-97, 1996.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth*, v. 75, p. 125-131, 1995.

DRDLA, R.; SANDKUHLER, J. Long-term potentiation at C-fibre synapses by low-level presynaptic activity in vivo. *Mol Pain*, v. 4, p. 1-8, 2008.

DUCHEN, M. R. Excitation of mouse motoneurons by GABA-mediated primary afferent depolarization. *Brain Res*, v. 379, p. 182-187, 1986.

DUGOVIC, C.; SHELTON, J.E.; ALUISIO, L.E.; FRASER, I.C.; JIANG, X.; SUTTON, S.W.; BONAVENTURE, P.; YUN, S.; LI, X.; LORD, B.; DVORAK, C.A.; CARRUTHERS, N.I.; LOVENBERG, T.W. Blockade of orexin-1 receptors attenuates orexin-2 receptor antagonism-induced sleep promotion in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 330, p. 142-51, 2009.

ECCLES, J. C.; SCHMIDT, R.F.; WILLIS, W.D. Presynaptic inhibition of the spinal monosynaptic reflex pathway. *J Physiol*, v. 161, p. 282-297, 1962.

ECCLES, J.C.; KOZAK, W.; MAGNI, F. Dorsal root reexes of muscle group I afferent fibres. *J Physiol*, v. 159, p. 128-146, 1961.

ENGLAND, S.; BEVAN, S.; DOCHERTY, R.J. PGE2 modulates the tetrodotoxinresistant sodium current in neonatal rat dorsal

root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J Physiol*, v. 495, p. 429-440, 1996.

ERAMIA, E.; AZHDARI-ZARMEHRIA, H.; GHASEMI-DASHKHASANA, E.; ESMAEILIA, M.; SEMNANIANC, S. Intra-paragigantocellularis lateralis injection of orexin-A has an antinociceptive effect on hot plate and formalin tests in rat. *Brain Res*, v. 1478, p. 16-23, 2012.

ERBENSHADE, T.A.; BROWMAN, K.E.; BITNER, R.S.; STRAKHOVA, M.; COWART, M.D.; BRIONI, J.D. The histamine H3 receptor: na attractive target for the treatment of cognitive disorders. *Br J Pharmacol*, v. 145, p. 1166-1181, 2008.

ERICSON, H.; WATANABE, T.; KOHLER, C. Morphological analysis of the tuberomammillary nucleus in the rat brain: delineation of subgroups with antibody against L-histidine decarboxylase as a marker. *J Comp Neurol*, v. 263, p. 1-24, 1987.

ERIKSSON, K.S.; SERGEEVA, O.; BROWN, R.E.; HAAS, H.L. Orexin/hypocretin excites the histaminergic neurons of the tuberomammillary nucleus. *J Neurosci*, v. 21, p. 9273-9279, 2001.

FELL, MJ.; FLIK, G.; DIJKMAN, U.; FOLGERING, J.H.A.; PERRY, K.W.; JOHNSON, B.J.; WESTERINK, B.H.C.; SVENSSON, K.A. Glutamatergic regulation of brain histamine neurons: In vivo microdialysis and electrophysiology studies in the rat. *Neuropharmacology*, v. 99, p. 1-8, 2015.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; DE CAMPOS, D.I. Induction, blockade and restoration of a persistent hypersensitive state. *Pain*, v. 42, p. 365-371, 1990.

FIELDS, H. L.; BASBAUM, A. I. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In Textbook of Pain, R. MELZACK AND P. WALL, eds. (London: Churchill Livingstone), p. 125-142; 2005.

FOLETTTO, V.R. A medula espinhal modula a simetria da artrite induzida por CFA em ratos. Tese doutorado, Departamento de Farmacologia, UFSC. 2015.

FUNDIN, B.T.; PFALLER, K.; RICE, F.L. Different distributions of the sensory and autonomic innervation among the microvasculature of the rat mystacial pad. *J Comp Neurol*, v. 389 p. 545–568, 1997.

GALAN, A.; CERVERO, F. Painful stimuli induce in vivo phosphorylation and membrane mobilization of mouse spinal cord NKCC1 co-transporter. *Neuroscience*, v. 133, p. 245–52, 2005.

GALEOTTI, N.; MALMBERG-AIELLO, P.; BARTOLINI, A.; SCHUNACK W.; GHELARDINI C. H1-receptor stimulation induces hyperalgesia through activation of the phospholipase C-PKC pathway. *Neuropharmacology*, v. 47, p. 295–303, 2004.

GARCIA-NICAS, E.; LAIRD, J.M.A.; CERVERO, F. GABAA-Receptor blockade reverses the injury-induced sensitization of nociceptor-specific (NS) neuron in the spinal dorsal horn of the rat. *J Neurophysiol*, v. 96, p. 661–670, 2006.

GIESLER G.J Evidence of direct nociceptive projections from the spinal cord to the hypothalamus and telencephalon. *Neuroscience*, v. 7, p. 253–261, 1995.

GILLARD, M.; VAN DER PERREN, C.; MOGUILEVSKY, N.; MASSINGHAM, R.; CHATELAIN, P. Binding characteristics of cetirizine and levocetirizine to human H1 histamine receptors: contribution of Lys191 and Thr194. *Mol Pharmacol*, v. 61, p. 391–399, 2002.

GOLD, M.S.; LEVINE, J.D.; CORREA, A.M. Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. *J Neurosci*, v. 18, p. 10345–10355, 1998.

GRANADOS-SOTO, V.; ARGUELLES, C.F.; ALVAREZ-LEEFMANS, F.J. Peripheral and central antinociceptive action of Na⁺–K⁺–2Cl[–] cotransporter blockers on formalin induced nociception in rats. *Pain*, v. 114, p. 231–238, 2005.

GRANJEIRO, E.M.; GOMES, F.V.; ALVES, F.H.; CRESTANI, C.C.; CORRÊA, F.M.; RESSTEL, L.B. Bed nucleus of the

stria terminalis and the cardiovascular responses to chemoreflex activation. *Auton Neurosci*, v. 167, p. 21-26, 2012.

HAAS, H.L.; REINER P.B. Membrane properties of histaminergic tuberomammillary neurones of the rat hypothalamus in vitro. *Journal of Physiology*, v. 399, p. 633-646, 1988.

HAAS, H.L.; SERGEEVA, O.A.; SELBACH, O. Histamine in the nervous system. *Physiol Rev*, v. 88, p. 1183–1241, 2008.

HABWINE, J.N.; TALAVERA, K.; VERBERT, L.; EGGERMONT, J.; VANDERWINDEN, J.M.; DE SMEDT, H.; VAN DEN BOSCH, L.; ROBBERECHT, W.; CALLEWAERT, G. Differential contribution of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter NKCC1 to chloride handling in rat embryonic dorsal root ganglion neurons and motor neurons. *FASEB*, v. 23, p. 1168–1176, 2009.

HANNU T. Reactive arthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, v. 25 p. 347–357, 2011.

HAXHIU, M.A.; TOLENTINO-SILVA, F.; PETE, G.; MACK, S.O. Monoaminergic neurons, chemosensation and arousal. *Respir Physiol*, v. 129, p. 191–209, 2001.

HERBERT, M.K.; HOLZER, P. Neurogenic inflammation. Pathophysiology and clinical implications. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, v. 37, p. 386-394, 2002.

HÉRON, A.; ROULEAU, A.; COCHOIS, V.; PILLOT, C.; SCHWARTZ, J.C.; ARRANG, J.M. Expression analysis of the histamine H(3) receptor in developing rat tissues. *Mech Dev*, v. 105, p. 167–173, 2001.

HILL, S.J.; GANELLIN, C.R.; TIMMERMAN, H.; SCHWARTZ, J.C.; SHANKLEY, N.P.; YOUNG, J.M.; SCHUNACK, W.; LEVI, R.; HAAS, H.L. International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol Rev*, v. 49, p. 253–278, 1997.

HOEVER, P.; HAAS, S.; WINKLER, J.; SCHOEMAKER, R.C.; CHIOSSI, E.; VAN GERVEN, J.; DINGEMANSE, J. Orexin receptor antagonism, a new sleep-promoting paradigm: an ascending

single-dose study with almorexant *Clin Pharmacol Ther.* v. 87, p. 593-600, 2010.

HOFSTRA, C.L.; DESAI, P.J.; THURMOND, R.L.; FUNG-LEUNG, W.P.; Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 305, p. 1212–1221, 2003.

HOLDEN, J.E.; NALEWAY, E. Microinjection of carbachol in the lateral hypothalamus produces opposing actions on nociception mediated by alpha1 and alpha2 adrenoceptors. *Brain Res*, v. 911, p. 27-36, 2001.

HOLZER, P. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. *Gen Pharmacol*, v. 30, p. 5-11, 1998.

HORVATH, T.L.; PEYRON, C.; DIANO, S.; IVANOV, A.; ASTON-JONES, G.; KILDUFF, T.S.; VAN DEN POL, A.N. Hypocretin (orexin) activation and synaptic innervation of the locus coeruleus noradrenergic system. *J Comp Neurol*, v. 415, p. 145–159, 1999.

HOUGH, L.B. Genomics meets histamine receptors: new subtypes, new receptor. *Mol Pharmacol*, v. 59, p. 415–419, 2001.

HUANG, Z.L.; QU, W.M.; LI, W.D.; MOCHIZUKI, T.; EGUCHI, N.; WATANABE, T.; URADE, Y.; HAYAISHI, O. Arousal effect of orexin A depends on activation of the histaminergic system. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 98, p. 9965–9970, 2001.

IEDA, M.; HASEGAWA, E.; KISANUKI, Y.Y.; SINTON, C.M.; YANAGISAWA, M.; SAKURAI, T. Differential roles of orexin receptor-1 and -2 in the regulation of non-REM and REM sleep. *J Neurosci*, v. 31, p. 6518–6526, 2011.

INAGAKI, N.; TODA, K.; TANIUCHI, I.; PANULA, P.; YAMATODANI, A.; TOHYAMA, M.; WATANABE, T.; WADA, H. An analysis of histaminergic efferents of the tuberomammillary nucleus to the medial preoptic area and inferior colliculus of the rat. *Exp Brain Res*, v. 80, p. 374–380, 1990.

ISHIZUKA, T.; YAMAMOTO, Y.; YAMATODANI, A. The effect of orexin-A and -B on the histamine release in the anterior hypothalamus in rats. *Neurosci Lett*, v. 323, p. 93–96, 2002.

ITOH, Y.; OISHI, R.; NISHIBORI, M.; SAEKI, K. Characterization of histamine release from the rat hypothalamus as measured by in vivo microdialysis. *J Neurochem*, v. 56, p. 769-774, 1991.

JANCSÓ, N.; JANCSÓ-GÁBOR, A.; SZOLCSÁNYI, J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol Chemother*, v. 31, p. 138-151, 1967.

JANSSEN, S.A.; ARTNZ, A. Anxiety and pain: Attentional and endorphinergic influences. *Pain*, v. 66, p. 145-150, 1996.

JANSSEN, S.A.; ARTNZ, A. Anxiety and pain: Attentional and endorphinergic influences. *Pain*, v. 66, p. 145-150, 1996.

JEANELLE PORTELLI, JESSICA COPPENS, THOMAS DEMUYSER, ILSE SMOLDERS. Des-acyl ghrelin attenuates pilocarpine-induced limbic seizures via the ghrelin receptor and not the orexin pathway. *Neuropeptides*, v. 51 p. 1–7, 2015.

JL, R.R.; WOOLF, C. J. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol Dis*, v. 8, p. 1–10, 2001.

JIANG, M.; BEHBEHANI, M.M. Physiological characteristics of the projection pathway from the medial preoptic to the nucleus raphe magnus of the rat and its modulation by the periaqueductal gray. *Pain*, v. 94, p. 147-1369, 2001.

JOHNSON, P.L.; MORATALLA, R.; LIGHTMAN, S.L.; LOWRY, C.A. Are tuberomammillary histaminergic neurons involved in CO₂- mediated arousal? *Exp Neurol*, v. 193, p. 228–233, 2005.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, v. 413, p. 203–210, 2001.

JUTEL, M.; WATANABE, T.; KLUNKER, S.; AKDIS, M.; THOMET, O.A.; MALOLEPSZY, J.; ZAK-NEJMARK, T.; KOGA, R.;

KOBAYASHI, T.; BLASER, K.; AKDIS, C.A. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature*, v. 413, p. 420–425, 2001.

KAJIHARA, Y.; MURAKAMI, M.; IMAGAWA, T.; OTSUGURO, K.; ITO, S.; OHTA, T. Histamine potentiates acid-induced responses mediating transiente receptor potential V1 in mouse primary sensory neurons. *Neuroscience*, v. 166, p. 292–304, 2010.

KANDELL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. *Principle of neural Science*. 4 ed. New York: McGraw-Hill, 2000.

KATAYAMA Y1, HIRAI K, HOMMA T, NODA Y, HONDA K. Actions of orexins on individual myenteric neurons of the guinea-pig ileum: orexin A or B? *Neuroreport*, v. 16 p. 745–749, 2002.

KELLER, A.F.; BEGGS, S.; SALTER, M.W.; DE KONINCK, Y. Transformation of the output of spinal lamina I neurons after nerve injury and micróglia stimulation underlying neuropathic pain. *Mol Pain*, v. 3, p. 2–7, 2007.

KILDUFF, T.S.; PEYRON, C. The hypocretin/orexin ligand-receptor system: implications for sleep and sleep disorders. *Trends Neurosci*, v. 23, p. 359–365, 2000.

KITS, K.L.; MANSVELDER, H.D. Regulation of exocytosis in neuroendocrine cells: spatial organization of channels and vesicles, stimulus secretion coupling, calcium buffers and modulation. *Brain Res Rev*, v. 33, p. 78–94, 2000.

KIYASHCHENKO, L. I.; MILEYKOVSKIY, B.Y.; MAIDMENT, N.; LAM, H.A.; WU, M.F.; JOHN, J.; PEEVER, J.; SIEGEL, J.M. Release of hypocretin (orexin) during waking and sleep states. *J Neurosci*, v. 22, p. 5282–5286, 2002.

KÖHLER, C.; SWANSON, L.; HAGLUND, L.; WU, J. The cytoarchitecture, histochemistry and pro jections of the tuberomammillary nucleus in the rat. *Neuroscience*, v. 16, p. 85–110, 1985.

KOLLONITSCH, J.; PERKINS, L.M.; PATCHETT, A.A.; DOLDOURAS, G.A.; MARBURG, S.; DUGGAN, D.E.; MAYCOCK,

A.L.; ASTER, S.D. Selective inhibitors of biosynthesis of aminergic neurotransmitters. *Nature*, v. 274, p. 906–908, 1978.

KOROTKOVA, T.M.; ERIKSSON, K.S.; HAAS, H.L.; BROWN, R.E. Selective excitation of GABAergic neurons in the substantia nigra of the rat by orexin/hypocretin in vitro. *Regul Pept.* v. 104, p. 83-89, 2002.

KOVELOWSKI, C.J.; OSSIPOV, M.H.; SUN, H.; LAI, J.; MALAN, T.P.; PORRECA, F. Supraspinal cholecystokinin may drive tone descending facilitation mechanisms to maintain neuropathic pain in the rat. *Pain*, v. 87, p. 265-273, 2000.

KOVELOWSKI, C.J.; OSSIPOV, M.H.; SUN, H.; LAI, J.; MALAN, T.P.; PORRECA, F. Supraspinal cholecystokinin may drive tone descending facilitation mechanisms to maintain neuropathic pain in the rat. *Pain*, v. 87, p. 265-273, 2000.

KRESS, M.; RODL, J.; REEH, P.W. Stable analogues of cyclic AMP but not cyclic GMP sensitize unmyelinated primary afferents in rat skin to heat stimulation but not to inflammatory mediators, in vitro. *Neuroscience*, 74, 609–617, 1996.

KRETZ, R. Local cobalt injection: a method to discriminate presynaptic axonal from postsynaptic neuronal activity. *J Neurosci Methods*, v. 11, p. 129 - 135, 1984.

KUDO, Y.; ABE, N.; GOTO, S.; FUKUDA, H. The chloride-dependent depression by GABA in the frog spinal cord. *Eur J Pharmacol*, v. 32, p. 251-259, 1975.

LAIRD, J.M.; CERVERO, F. A comparative study of the changes in receptive-field properties of multireceptive and nociceptive rat dorsal horn neurons following noxious mechanical stimulation. *J Neurosci*, v. 9, p. 854-63, 1989.

LAIRD, J.M.; GARCIA-NICAS, E.; DELPIRE, E.J.; CERVERO, F. Presynaptic inhibition and spinal pain processing in mice: a possible role of the NKCC1 cation-chloride co-transporter in hyperalgesia. *Neurosci Lett*, v. 361, p. 200–203, 2004.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C.J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain*, v. 10, p. 895–926, 2009.

LEIRISALO-REPO, M.; HELENIUS, P.; HANNU, T.; LEHTINEN, A.; KREULA, J.; TAAVITSAINEN, M. Long-term prognosis of reactive salmonella arthritis. *Ann Rheum Dis*, v. 56, p. 516–520, 1997.

LEURS, R.; TRAIFFORT, E.; ARRANG, J.M.; TARDIVEL LACOMBE, J.; RUAT, M.; SCHWARTZ, J.C. Guinea pig histamine H1 receptor. II. Stable expression in Chinese hamster ovary cells reveals the interaction with three major signal transduction pathways. *J Neurochem*, v. 62, p. 519–527, 1994.

LEVINE, J. D.; MOSKOWITZ, M. A.; BASBAUM, A. I. The contribution of neurogenic inflammation in experimental arthritis. *J Immunol*, v. 135, p. 843–847, 1985.

LIM, H.D.; VAN RIJN, R.M.; LING, P.; BAKKER, R.A.; THURMOND, R.L.; LEURS, R. Evaluation of histamine H1-, H2-, and H3-receptor ligands at the human histamine H receptor: identification of 4-methylhistamine as the first potent and selective H4 receptor agonist. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 314, p. 1310–1321, 2005.

LIN, Q.; ZOU, X.; WILLIS, W. D. A-delta and C primary afferents convey dorsal root reflexes after intradermal injection of capsaicin in rats. *J Neurophysiol*, v. 84, p. 2695–2698, 2000.

LINO-DE-OLIVEIRA, C.; LIMA, T.C.M.; CAROBREZ, A.P. Dorsal periaqueductal gray matter inhibits passive coping strategy elicited by forced swimming stress in rats. *Life Sci*, v. 83, p. 118–21, 2008.

LU, V.B.; BIGGS, J.E.; STEBBING, M.J.; BALASUBRAMANYAN, S.; TODD, K.G.; LAI, A.Y.; COLMERS, W.F.; DAWBARN, D.; BALLANYI, K.; SMITH, P.A. Brain-derived neurotrophic factor drives the changes in excitatory synaptic transmission in the rat superficial dorsal horn that follow sciatic nerve injury. *J Physiol*, v. 587 p. 1013–1032, 2009.

LUMB, B.M. Hypothalamic influences on visceros-somatic neurons in the lower thoracic spinal cord of the anaesthetized rat. *J Physiol*, v. 424, p. 427-444, 1990.

LUND, P.E.; SHARIATMADARI, R.; UUSTARE, A., et al. The orexin OX1 receptor activates a novel Ca^{2+} influx pathway necessary for coupling to phospholipase. *C J Biol Chem*, v. 275, p. 30806-30812, 2000.

LYNN, B. Neurogenic inflammation caused by cutaneous polymodal receptors. *Prog Brain Res*, v. 113, p. 361-368, 1996.

MA, R.Z.; GAO, J.; MEEKER, N.D.; FILLMORE, P.D.; TUNG, K.S.; WATANABE, T.; ZACHARY, J.F.; OFFNER, H.; BLANKENHORN, E.P.; TEUSCHER, C. Identification of Bphs, an autoimmune disease locus, as histamine receptor H1. *Science*, v. 297, p. 620-623, 2002.

MALAN, T.P., MATA, H.P., PORRECA, F. Spinal GABA(A) and GABA(B) receptor pharmacology in a rat model of neuropathic pain. *Anesthesiology*, v. 96, p. 1161-1167, 2002.

MALMBERG-AIELLO, P.; LAMBERTI, C.; GHELARDINI, C.; GIOTTI, A.; BARLOLINI, A. Role of histamine in rodent antinociception. *Br J Pharmacol*, v. 111, p. 1269-1279, 1994.

MALMBERG-AIELLO, P.; LAMBERTI, C.; IPPONI, A.; HANNINEN, J.; GHELARDINI, C.; BARTOLINI, A. Effects of two histamine-N-methyltransferase inhibitors, SKF 91488 and BW 301U, in rodent antinociception. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, v. 355, p. 354-360, 1997.

MANNION, R.J.; COSTIGAN, M.; DECOSTERD, I.; AMAYA, F.; MA, Q.P.; HOLSTEGE, J.C.; JI, R.R.; ACHESON, A.; LINDSAY, R.M.; WILKINSON, G.A.; WOOLF, C.J. Neurotrophins: peripherally and centrally acting modulators of tactile stimulus-induced inflammatory pain hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 96, p. 9385-9390, 1999.

MARCUS, J.N.; ASCHKENAS, I.C.J.; LEE, C.E.; CHEMELLI, R.M.; SAPER, C.B.; YANAGISAWA, M.; ELMQUIST, J.K. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol*, v. 435, p. 6-25, 2001.

MEDHURST, S.J.; COLLINS, S.D.; BILLINTON, A.; BINGHAM, S.; DALZIEL, R.G.; BRASS, A.; ROBERTS, J.C.; MEDHURST, A.D.; CHESSELL, I.P. Novel histamine H3 receptor antagonists GSK189254 and GSK334429 are efficacious in surgically-induced and virally-induced rat models of neuropathic pain. *Pain*, v. 138, p. 61–69, 2008.

MELZACK, R.; WALL, P.D. Pain mechanisms: a new theory. *Science* v. 150, p. 971–979, 1965.

MELZACK, R.; WALL, P.D.; TY, T.C. Acute pain in an emergency clinic: latency of onset and descriptor patterns related to different injuries. *Pain*, v. 14, p. 33–43, 1982.

MELZACK, R.; WALL, P.D.; TY, T.C. Acute pain in an emergency clinic: latency of onset and descriptor patterns related to different injuries. *Pain*, v. 14, p. 33–43, 1982.

MIKLOS, I. H.; KOVACS, K.J. Functional heterogeneity of the responses of histaminergic neuron subpopulations to various stress challenges. *Eur J Neurosci*, v. 13, p. 3069–3079, 2003.

MILETIC, G., MILETIC, V. Loose ligation of the sciatic nerve is associated with TrkB receptor-dependent decreases in KCC2 protein levels in the ipsilateral spinal dorsal horn. *Pain*, v. 137, p. 532–539, 2008.

MILEYKOVSKIY, B.Y.; KIYASHCHENKO, L.I.; SIEGEL, J.M. Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons. *Neuron*, v. 46, p. 787–798, 2005.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, v. 57, p. 1–164, 1999.

MIZOGUCHI, H.; KOMATSU, T.; IWATA, Y.; WATANABE, C.; WATANABE, H.; ORITO, T.; KATSUYAMA, S.; YONEZAWA, A.; ONODERA, K.; SAKURADA, T.; SAKURADA, S. Involvement of glial cells in the nociceptive behaviors induced by a high-dose of histamine administered intrathecally. *Eur J Pharmacol*, v. 653, p. 21–25, 2011a.

MIZOGUCHI, H.; KOMATSU, T.; IWATA, Y.; WATANABE, C.; WATANABE, H.; ORITO, T.; KATSUYAMA, S.;

YONEZAWA, A.; ONODERA, K.; SAKURADA, T.; SAKURADA, S. Partial involvement of NMDA receptors and glial cells in the nociceptive behaviors induced by intrathecally administered histamine. *Neurosci Lett*, v. 495, p. 83-87, 2011b.

MOBARAKEH, J.I.; TAKAHASHI, K.; SAKURADA, S.; NISHINO, S.; WATANABE, H.; KATO, M.; NAGHDI, N.; YANAI, K. Enhanced antinociception by intracerebroventricularly administered orexin A in histamine H1 or H2 receptor gene knockout mice. *Pain*, v. 118, p. 254–262, 2005.

MORAIRTY, S.R.; WILK, A.J.; LINCOLN, W.U.; NEYLAN, T.C.; KILDUFF, T.S. The hypocretin/orexin antagonist almoxexant promotes sleep without impairment of performance in rats. *Front Neurosci*, v. 8, p. 1-8, 2014.

MORALES-AZA, B.M.; CHILLINGWORTH, N.L.; PAYNE, J.A.; DONALDSON, L.F. Inflammation alters cation chloride cotransporter expression in sensory neurons. *Neurobiol Dis*, v. 17, p. 62–69, 2014.

MUNARI, L.; PROVENSI, G.; PASSINI, M.B.; BLANDINA, P. Selective brain region activation by histamine H3 receptor antagonists/inverse agonist ABT-239 enhances acetylcholine and histamine release and increases c-Fos expression. *Neuropharmacology*, v. 70, p. 131-140, 2013.

NINKOVIC, M.; HUNT, S.P. Opiate and histamine H1 receptors are present on some substance P-containing dorsal root ganglion cells. *Neurosci Lett*, v. 53, p. 133–137, 1985.

ODA, T.; MORIKAWA, N.; SAITO, Y.; MASUHO, Y.; MATSUMOTO, S. Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *J Biol Chem*, v. 275, p. 36781– 36786, 2000.

OKAKURA, K., YAMATODANI, A., MOCHIZUKI, T., HORII, A., WADA, H. Glutamatergic regulation of histamine release from rat hypothalamus. *Eur J Pharmacol*, v. 213, p. 189-192, 1992.

OLSEN, U.B.; ELTORP, C.T.; INGVARSEN, B.K.; JØRGENSEN, T.K.; LUNDBAEK, J.A.; THOMSEN, C.; HANSEN,

A.J. ReN 1869, a novel tricyclic antihistamine, is active against neurogenic pain and inflammation. *Eur J Pharmacol*, v. 435, p. 43–57, 2002.

OZCAN, M., AYAR, A., SERHATLIOGLU, I., ALCIN, E., SAHIN, Z., KELESTIMUR, H. Orexins Activates Protein Kinase C-Mediated Ca^{2+} Signaling in Isolated Rat Primary Sensory Neurons. *Physiol Res*, v. 59, p. 255–262, 2010.

PANULA, P.; AIRAKSINEN, M.S.; PIRVOLA, U.; KOTILAINEN, E. A histaminecontaining neuronal system in human brain. *Neuroscience*, v. 34, p. 127–132, 1990.

PANULA, P.; FLÜGGE, G.; FUCHS, E.; PIRVOLA, U.; AUVINEN, S.; AIRAKSINEN, M.S. Histamine-immunoreactive nerve fibers in the mammalian spinal cord. *Brain Res*, v. 484, p. 234–9, 1989.

PANULA, P.; NUUTINEN, S. The histaminergic network in the brain: basic organization and role in disease. *Nat Rev Neurosci*, v. 14, p. 472–487 2013.

PANULA, P.; PIRVOLA, U.; AUVINEN, S.; AIRAKSINEN, M.S. Histamine immunoreactive nerve fibers in the rat brain. *Neuroscience*, v. 28 p. 585–610, 1989.

PANULA, P.; YANG, H. Y.; COSTA, E. Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci*, v. 81, p. 2572–2576, 1984.

PARKS, G.S.; WARRIER, D.R.; DITTRICH, L.; SCHWARTZ, M.D.; PALMERSTON, J.B.; NEYLAN, T.C.; MORAIRTY, S.R.; KILDUFF, T.S. The Dual Hypocretin Receptor Antagonist Almorexant is Permissive for Activation of Wake-Promoting Systems. *Neuropsychopharmacology*, v. 41, p. 1444–1455, 2016.

PEDOTTI, R., DE VOSS, J.J., STEINMAN, L., GALLI, S.J. Involvement of both “allergic” and “autoimmune” mechanisms in EAE, MS and other autoimmune diseases. *Trends Immunol*, v. 24, p. 479–484, 2003.

PEYRON, C.; TIGHE, D.K.; VAN DEN POL, A.N; DE LECEA, L.; HELLER, H.C.; SUTCLIFFE, J.G.; KILDUFF, T.S. Neurons

containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci*, v. 18, p. 9996–10015, 1998.

PITCHER, M.H. PRICE, T.J. ENTRENA, J.M. CERVERO, F. Spinal NKCC1 blockade inhibits TRPV1-dependent referred allodynia. *Mol Pain*, v. 3, p. 1-7, 2007.

PITCHER. M.H.; CERVERO, F. Role of the NKCC1 co-transporter in sensitization of spinal nociceptive neurons. *Pain*, v. 151, p. 756-62, 2010.

POLLARD, H.; MOREAU, J.; ARRANG, J.M.; SCHWARTZ, J.C. A detailed autoradiographic mapping of histamine H3 receptors in rat brain areas. *Neuroscience*, v. 52, p. 169–189, 1993.

PRAST, H.; PRAST, M.; PHILIPPU, A. H3 autoreceptors and muscarinic acetylcholine receptors modulate histamine release in the anterior hypothalamus of freely moving rats. *Agents Actions*, v. 41, p. 64–65, 1994.

PRELL, G.D.; GREEN, J.P. Histamine as a neuroregulator. *Annu. Ver. Neurosci.* v. 9, p. 209-254, 1986.

PRICE, T.J.; CERVERO, F.; KONINCK, Y. Role of cation-chloride-cotransporters (CCC) in pain and hyperalgesia. *Curr Top Med Chem*, v. 5, p. 547–555, 2005.

PRICE, T.J.; HARGREAVES, K.M.; CERVERO, F. Protein expression and mRNA cellular distribution of the NKCC1 cotransporter in the dorsal root and trigeminal ganglia of the rat. *Brain Res*, v. 1112, p. 146–158, 2006.

REES, H.; SLUKA, K.A.; WESTLUND, K.N.; WILLIS, W.D. The role of glutamate and GABA receptors in the generation of dorsal root reflexes by acute arthritis in the anaesthetized rat. *J Physiol.* v. 484, p. 437-445, 1995.

REES, H.; SLUKA, K.A.; WESTLUND, K.N.; WILLIS, W.D. Do dorsal root reflexes augment peripheral inflammation? *Neuroreport*, v. 5, p. 821-824, 1994.

RICHELSON E. Histamine H1 receptor-mediated guanosine 3',5'-monophosphate formation by cultured mouse neuroblastoma cells. *Science*, v. 201, p. 69–71, 1978.

ROCHA-GONZALEZ, H.I.; MAO, S.; ALVAREZ-LEEFMANS, F.J. Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransport and intracellular chloride regulation in rat primary sensory neurons: thermodynamic and kinetic aspects. *J Neurophysiol*, v. 100, p. 169–184, 2008.

RUDOMIN, P.; SCHMIDT, R.F.; Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Exp Brain Res*, v. 129, p. 1–37, 1999.

SACHS, D.; VILLARREAL, C.; CUNHA, F.; PARADA, C.; FERREIRA, S. The role of PKA and PKCepsilon pathways in prostaglandin E2-mediated hypernociception. *British journal of pharmacology*, v. 156, p. 826-834, 2009.

SAKURADA, S.; WATANABE, H.; MIZOGUCHI, H.; YONEZAWA, A.; ORIT, T.; KATSUYAMA, S.; KURAMASU, A.; SAKURADA, C.; YANAY, K.; SAKURADA, T. Involvement of the histaminergic system in the nociceptin-induced pain-related behaviors in the mouse spinal cord. *Pain*, v. 112, p. 171-182, 2004.

SAKURADA, S.; ORIT, T.; FURUTA, S.; WATANABE, H.; MOBARAKEH, J. I.; YANAI, K.; WATANABE, T.; SATO, T.; ONODERA, K.; SAKURADA, C.; SAKURADA, T. Intrathecal histamine induces spinally mediated behavioral response through tachykinin NK1 receptors. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 74, p. 489-493, 2003.

SAKURAI, T. Orexins and orexin receptors: implication in feeding behavior. *Regul Pept*, v. 85, p. 25–30, 1999.

SAKURAI, T.; AMEMIYA, A.; ISHII, M.; MATSUZAKI, I.; CHEMELLI, R.M.; TANAKA, H.; WILLIAMS, S.C.; RICHARDSON, J.A.; KOZLOWSKI, G.P.; WILSON, S.; ARCH, J.R.; BUCKINGHAM, R.E.; HAYNES, A.C.; CARR, S.A.; ANNAN, R.S.; MCNULTY, D.E.; LIU, W.S.; TERRETT, J.A.; ELSHOURBAGY, N.A.; BERGSMA, D.J.; YANAGISAWA, M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, v. 92, p. 573–585, 1998.

SANDKUHLER, J. Understanding LTP in pain pathways. *Molecular Pain*, v. 3, p. 1- 9, 2007.

SCHAIBLE, H. G., AND GRUBB, B. D. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain*, v. 55, p. 5-54, 1993.

SCHOEPP, D.D. Unveiling the functions of presynaptic metabotropic glutamate receptors in the central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 299, p. 12-20, 2001.

SCHÖNE, C.; APERGIS-SCHOUTE, J.; SAKURAI, T.; ADAMANTIDIS, A.; BURDAKOV, D. Coreleased Orexin and Glutamate Evoke Nonredundant Spike Outputs and Computations in Histamine Neurons. *Cell Reports*, v. 7, p. 697–704, 2014.

SCHÖNE, C.; HUANG CAO, Z.F.; APERGIS-SCHOUTE, J.; ADAMANTIDIS, A.; SAKURAI, T.; BURDAKOV, D. Optogenetic Probing of Fast Glutamatergic Transmission from Hypocretin/Orexin to Histamine Neurons *In Situ*. *J Neurosci*, v. 5, p. 12437–12443, 2012.

SCULPTOREANU, A.; ARTIM, D.E.; DE GROAT, W.C. Neurokinins inhibit low threshold inactivating K⁺ currents in capsaicin responsive DRG neurons. *Experimental Neurology*, v. 219, p. 562–73, 2009.

SELBACH, O.; BROWN, R.E.; HAAS, H.L. Long-term increase of hippocampal excitability by histamine and cyclic AMP. *Neuropharmacology*, v. 36, p. 1539–1548, 1997.

SELMİ, C.; Gershwin M.E. Diagnosis and classification of reactive arthritis. *Autoimmunity Reviews*, v. 13, p. 546–549, 2014.

SEWARD, E.P.; CHERNEVSKAYA, N.I.; NOWYCKY, M.C. Exocytosis in peptidergic nerve terminals exhibits two calcium-sensitive phases during pulsatile calcium entry. *J Neurosci*, v. 15 p. 3390–3399, 1995.

SHAN, L.; DAUVILLIERS, Y.; SIEGEL, J.M. Interactions of the histamine and hypocretin systems in CNS disorders. *Nat Rev Neurol*, v. 7, p. 1-13, 2015.

SIEPER, J.; RUDWALEIT, M.; BRAUN, J.; VAN DER HEIJDE, D. Diagnosing reactive arthritis: role of clinical setting in the value of serologic and microbiologic assays. *Arthritis & Rheumatism*, v. 46, p. 319–27, 2002.

SIVILOTTI, L.; WOOLF, C.J. The contribution of GABAA and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. *J Neurophysiol*, v. 72, p. 169–179, 1994.

SLUKA, K. A., WESTLUND, K. N. Behavioral and immunohistochemical changes in an experimental arthritis model in rats. *Pain*, v. 55, p. 367–377, 1993.

SLUKA, K.A., WILLIS, W.D., WESTLUND, K.N. The role of dorsal root reflexes in neurogenic inflammation. *Pain Forum*, v. 4, p. 141–149, 1995b.

SLUKA, K.A.; LAWAND, N.B.; WESTLUND, K.N. Joint inflammation is reduced by dorsal rhizotomy and not by sympathectomy or spinal cord transection. *Ann Rheum Dis*, v. 53, p. 309–314, 1994.

SLUKA, K.A.; REES, H.; WESTLUND, K.N.; WILLIS, W.D. Fiber types contributing to dorsal root reflexes induced by joint inflammation in cats and monkeys. *J. Neurophysiol.* v. 74, p. 981–989, 1995a.

STEIN, T. ETO, C. MASCARIN, L. FIN, F.E. SOUZA-SILVA, E. TONUSSI, C.R. Histaminergic pharmacology modulates analgesic and anti-edematogenic effects produced by spinally-injected morphine. *Anesth analg*, v. 123, p. 238–243, 2016.

STEINER, M. A.; LECOURT, H.; STRASSER, D. S.; BRISBARE-ROCH, C.; JENCK, F. Differential effects of the dual orexin receptor antagonist almorexant and the GABA(A)-alpha1 receptor modulator zolpidem, alone or combined with ethanol, on motor performance in the rat. *Neuropsychopharmacology*, v. 36, p. 848–856, 2011.

STERN, C.A.J.; DO MONTE, F.H.M.; GAZARINI, L.; CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, L.J. Activity in prelimbic cortex is

required for adjusting the anxiety response level during the elevated plus-maze retest. *Neuroscience*, v. 170, p. 214–222, 2010.

STEVENS, D.R.; ERIKSSON, K.S.; BROWN, R.E.; HAAS, H.L. The mechanism of spontaneous firing in histamine neurons. *Behav Brain Res*, v. 124, p. 105–112, 2001.

STEVENS, D.R.; HAAS, H.L. Calcium-dependent prepotentials contribute to spontaneous activity in rat tuberomammillary neurons. *J Physiol*, v. 493, p. 747–754, 1996.

SUNDEVIK, M.; KUDO, H.; TOIVONEN, P.; ROZOV, S.; CHEN, Y.C.; PANULA, P. The histaminergic system regulates wakefulness and orexin/hypocretin neuron development via histamine receptor H1 in zebrafish. *FASEB*, v. 25, p. 4338–4347, 2011.

SUNDEVIK, M.; PANULA, P. Interactions of the orexin/hypocretin neurones and the histaminergic system. *Acta Physiol. (Oxf.)* v. 213, p. 321–333, 2015.

SUNG, KW.; KIRBY, M.; MCDONALD, MP.; LOVINGER, DM.; DELPIRE, E. Abnormal GABAA receptor-mediated currents in dorsal root ganglion neurons isolated from Na-K-2Cl cotransporter null mice. *J Neurosci*, v. 20, p. 7531–38, 2000.

TAIWO, Y.O.; BJERKNES, L.K.; GOETZL, E.J.; LEVINE, J.D. Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. *Neuroscience*, v. 32, p. 577–580, 1989.

TAIWO, Y.O.; LEVINE J.D. Further confirmation of the role of adenylyl cyclase and of cAMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. *Neuroscience*, v. 44, p. 131–135, 1991.

TAKADA, M.; LI, Z.K.; HATTORI, T. a direct projection from the tuberomammillary nucleus to the spinal cord in the rat. *Neuroscience letters*, v. 79, p. 257–262, 1987.

TAKEDA, N.; INAGAKI, S.; TAGUCHI, Y.; TOHYAMA, M.; WATANABE, T.; WADA H. Origins of histamine-containing fibers in the cerebral cortex of rats studied by immunohistochemistry with histidine decarboxylase as a marker and transection. *Brain Res*, v. 323, p. 55–63, 1984.

TAKESHITA, Y.; WATANABE, T.; SAKATA, T.; MUNAKATA, M.; ISHIBASHI, H.; AKAIKE, N. Histamine modulates high-voltage-activated calcium channels in neurons dissociated from the rat tuberomammillary nucleus. *Neuroscience*, v. 87, p. 797-805, 1998.

TEUSCHER, C.; POYNTER, M.E.; OFFNER, H.; ZAMORA, A.; WATANABE, T.; FILLMORE, P.D.; ZACHARY, J.F.; BLANKENHORN, E.P. Attenuation of Th1 effector cell responses and susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis in histamine H2 receptor knockout mice is due to dysregulation of cytokine production by antigen-presenting cells. *Am J Pathol*, v. 164, p. 883–892, 2004.

TEUSCHER, C.; SUBRAMANIAN, M.; NOUBADE, R.; GAO, J.F.; OFFNER, H.; ZACHARY, J.F.; BLANKENHORN, E.P. Central histamine H3 receptor signaling negatively regulates susceptibility to autoimmune inflammatory disease of the CNS. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 104, p. 10146–10151, 2007.

THURMOND, R.L.; GELFAND, E.W.; DUNFORD, P.J. The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. *Nat Rev Drug Discov*, v. 7, p. 41–53, 2008.

TORREALBA, F.; YANAGISAWA M.; SAPER CB. Colocalization of orexin a and glutamate immunoreactivity in axon terminals in the tuberomammillary nucleus in rats. *Neuroscience*, v. 119, p. 1033–1044, 2003.

TORSNEY, C.; MACDERMOTT, A.B. Disinhibition opens the gate to pathological pain signaling in superficial neurokinin 1 receptor-expressing neurons in rat spinal cord. *J Neurosci*, v. 26, p. 1833–1843, 2006.

TRIGGIANI, M.; PETRAROLI, A.; LOFFREDO, S.; FRATTINI, A.; GRANATA, F.; MORABITO, P.; STAIONO, RI.; SECONDO, A.; ANNUNZIATO, L.; MARONE G. Differentiation of monocytes into macrophages induces the upregulation of histamine H1 receptor. *J Allergy Clin Immunol*, v. 119, p. 472–481, 2007.

UEDA, M.; KURAISHI, Y.; SATOH, M. Detection of capsaicin-evoked release of glutamate from spinal dorsal horn slices of rat with on-line monitoring system. *Neurosci Lett*, v. 155, p. 179-182, 1993.

VALENCIA-DE ITA, S.; LAWAND, N.B.; LIN, Q.; CASTANEDA-HERNANDEZ, G.; WILLIS, W.D. Role of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in the development of capsaicin-induced neurogenic inflammation. *J Neurophysiol*, v. 95, p. 3553–3561, 2006.

VAN DEN POL, A.N.; GAO, X.B.; OBRIETAN, K.; KILDUFF, T.S.; BELOUSOV, A.B. Presynaptic and postsynaptic actions and modulation of neuroendocrine neurons by a new hypothalamic peptide, hypocretin/orexin. *J Neurosci*, v. 18, p. 7962–7971, 1998.

VELÁZQUEZ, K.T.; MOHAMMAD, H.; SWEITZER, S.M. Protein kinase C in pain: involvement of multiple isoforms. *Pharmacol Res*, v. 55, p. 578–589, 2007.

VERDIERE, M.; ROSE, C.; SCHWARTZ, J.C. Turn over of cerebral histamine in a stressful situation. *Brain Res*, v. 129, p. 107–119, 1977.

VERHAGE, M.; MCMAHON, C.D.; GHIJSEN, W.E.J.M.; BOOMSMA, F.; SCHOLTEN, G.W.V.M.; NICHOLLS, G. Differential release of amino acids, neuropeptides and catecholamines from isolated nerve terminals. *Neuron*, v. 6, p. 517–524, 1991.

VILELA, M. G; SANTOS, J. L.; SILVA J. G. C. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. *Femina*, v. 35, p. 667–670, 2007.

VINOGRADOVA, E. P.; ZHUKOV, D. A.; BATUEV, A. S. The effects of stages of the estrous cycle on pain thresholds in female white rats. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, v. 33, n. 3, p. 269–72, 2003.

VOLLINGA, R.C.; DE KONING, J.P.; JANSEN, F.P.; LEURS, R.; MENGE, W.M.; TIMMERMAN, H. A new potent and selective histamine H₃ receptor agonist, 4-(1H-imidazol-4-ylmethyl) piperidine. *J Med Chem*, v. 37, p. 332–333, 1994.

WADA, H.; INAGAKI, N.; ITOWI, N.; YAMATODANI, A. Histaminergic neuron system in the brain: distribution and possible functions. *Brain Res Bull*, v. 27, p. 367–370, 1991.

WAHLESTEDT, C.; SKAGERBERG, G.; HÅKANSON, R.; SUNDLER, F.; WADA, H.; WATANABE T. Spinal projections of

hypothalamic histidine decarboxylaseimmunoreactive neurones. *Agents Actions*, v. 16, p. 231-3, 1985.

WALTKINS, L.R.; MAIER, S.F GOEHLER, L.E. Immune activation: the role of proinflammatory cytokines in inflammation, illness response and pathological pain states. *Pain*, v. 63, p. 289-302. 1995.

WALTKINS, L.R.; MAIER, S.F GOEHLER, L.E. Immune activation: the role of proinflammatory cytokines in inflammation, illness response and pathological pain states. *Pain*, v. 63, p. 289-302. 1995

WATANABE, C.; ORITO, T.; WATANABE, H.; MIZOGUCHI, H.; YONEZAWA, H.; YANAI, K.; MOBARAKEH, JI.; ONODERA, K.; SAKURADA, T.; SAKURADA, S. Intrathecal high-dose histamine induces spinally-mediated nociceptive behavioral responses through a polyamine site of NMDA receptors. *European Journal of Pharmacology*, v. 581, p. 54–63, 2008.

WATANABE, T.; TAGUCHI, Y.; HAYASHI, H.; TANAKA, J.; SHIOSAKA, S.; TOHYAMA, M.; KUBOTA, H.; TERANO, Y.; WADA, H.L. Evidence for the resence of a histaminergic neuron system in the rat brain: an immunohistochemical analysis. *Neurosci Lett*, v. 39, p. 249-254, 1983.

WATSON, S.L.; WATSON, C.J.; BAGHDOYAN, H.A.; LYDIG, R. Thermal nociception is decreased by hypocretin-1 and an adenosine A1 receptor agonist microinjected into the pontine reticular formation of Sprague Dawley rat. *J Pain*, v. 11, p. 535–544, 2010.

WESTERINK, B.; CREMERS, T.; VRIES, J.D.; LIEFERS, H.; TRAN, N.; BOER, P.D. Evidence for activation of histamine H3 autoreceptors during hand ling stress in the pre-frontal cortex of the rat. *Synapse*, v. 15, p. 238–243, 2002.

WILLIS, E.F.; CLOUGH, G.F.; CHURCH, M.K. Investigation into the mechanisms by which nedocromil sodium, frusemide and bumetanide inhibit the histamine-induced itch and flare response in human skin in vivo. *Clin Exp Allergy*. v. 34, p. 450–455, 2004.

WILLIS, W.D. Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: a double-edged sword. *Exp Brain Res*, v. 124, p. 395-42, 1999.

WOOLF, C.J. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature*, v. 306, p. 686–688, 1983.

WOOLF, C.J.; SALTER, M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, v. 288, p. 1765–1768, 2000.

WOOLF, C.J.; SHORTLAND, P.; SIVILOTTI, L.G. Sensitization of high mechano- threshold superficial dorsal horn and flexor motor neurones following chemosensitive primary afferent activation. *Pain*, v. 58, p. 141–55, 1994.

WORKMAN, B.J.; LUMB, B.M. Inhibitory effects evoked from the anterior hypothalamus are selective for the nociceptive responses of dorsal horn neuron with high and low threshold inputs. *J Neurophysiol*, v. 77, p. 1583–2831, 1997.

YAKSH, T. L. Substance P release from knee joint afferent terminals: modulation by opioids. *Brain Res*, v. 458, p. 319–324, 1988.

YAMANAKA, A.; TSUJINO, N.; FUNAHASHI, H.; HONDA, K.; GUAN, J.L.; WANG, Q.P.; TOMINAGA, M.; GOTO, K.; SHIODA, S.; SAKURAI, T. Orexin activates histaminergic neurons via the orexin 2 receptors. *Biochem Biophys Res Comm*, v. 290, p. 1237–1245, 2002.

YANG, Q.Z.; HATTON, G.I. Electrophysiology of excitatory and inhibitory afferents to rat histaminergic tuberomammillary nucleus neurons from hypothalamic and forebrain sites. *Brain Res*, v. 773, p. 162–172, 1997.

YANOVSKY, Y.; ZIGMAN, J.M.; KERNDER, A.; BEIN, A.; SAKATA, I.; OSBORNE-LAWRENCE, S.; HAAS, H.L.; SERGEEVA, O.A. Proton and ammonium sensing by histaminergic neurons controlling wakefulness. *Front Syst Neurosci*, v. 13, p. 6–23, 2012.

YOSHIDA, A.; MOBARAKEH, J.I.; SAKURAI, E.; SAKURADA, S.; ORITO, T.; KURAMASU, A.; KATO, M.; YANAI, K. Intrathecally-administered histamine facilitates nociception through tachykinin NK1 and histamine H1 receptors: a study in histidine decarboxylase gene knock-out mice. *Eur J Pharmacol*, v. 17, p. 55–62, 2005.

8. ANEXO

Tabela 2 - Dados dos animais que receberam a microinjeção intracerebral fora do TMNv. Os dados relatam as estruturas atingidas e os parâmetros avaliados, tempo de elevação da pata e diâmetro articular. Os dados são expressos por média \pm EPM para grupos com “n” maior que 3 animais ou o valor absoluto de cada animal para grupos com “n” menor que 3 animais.

Tratamento	nº	Estruturas	TEP	DA
Dados referentes ao experimento glutamato X PBS				
PBS	1	Pedúnculo cerebelar	26,95	0,0825
PBS	1	Pedúnculo cerebelar	39,47	0,120
GLU	4	Pedúnculo cerebelar; núcleo hipotalâmico arqueado; núcleo pré-mamilar ventral; parte peduncular da área hipotalâmica lateral	38,21 \pm 6,268	0,095 \pm 0,015
Dados referentes ao experimento cloreto de cobalto X PBS				
PBS	4	Pedúnculo cerebelar; núcleo pré-mamilar dorsal (2); hipotálamo posterior	30,487 \pm 4,281	0,066 \pm 0,012
Cobalto	4	Pedúnculo cerebelar; parte peduncular da área hipotalâmica lateral; núcleo pré-mamilar ventral (2)	23,14 \pm 5,298	0,032 \pm 0,011

**Dados referentes ao experimento glutamato intracerebral X
bloqueio medular do receptor H1**

PBS + SAL	3	Pedúnculo cerebelar; núcleo hipotalâmico arqueado; núcleo hipotalâmico	32,125 ± 4,251	0,121 ± 0,013
PBS + CET	1	Pedúnculo cerebelar	27,675	0,0825
PBS + CET	1	Núcleo pré-mamilar dorsal	35,025	0,0875
GLU + SAL	3	Pedúnculo cerebelar (2); parte peduncular da área hipotalâmica lateral	41,965 ± 5,14	0,13 ± 0,06
GLU + CTZ	4	Núcleo pré-mamilar ventral (2); núcleo pré-mamilar dorsal; núcleo subtalâmico	32,581 ± 4,32	0,089 ± 0,006

**Dados referentes ao experimento glutamato intracerebral X
bloqueio medular do cotransportador NKCC1**

PBS + BICA	3	Pedúnculo cerebelar; parte peduncular da área hipotalâmica lateral (2)	38,333 ± 3,21	0,112 ± 0,03
PBS + BUMET	3	Núcleo hipotálamo lateral; núcleo pré-mamilar dorsal; parte peduncular área hipotal. lateral	36,333 ± 4,884	0,087 ± 0,019
GLU + BICA	3	Pedúnculo cerebelar; núcleo pré-mamilar dorsal; parte peduncular área hipotal. lateral	43,25 ± 2,983	0,155 ± 0,035
GLU + BUME	3	Pedúnculo cerebelar núcleo; pré-mamilar	34,833 ± 3,144	0,102 ± 0,01

		ventral; parte peduncular área hipotal. lateral		
Dados referentes ao experimento orexina B e antagonista				
PBS + 0,01 % DMSO	4	Pedúnculo cerebelar (2); núcleo pré-mamilar ventral; hipotálamo posterior	39,4 ± 3,641	0,09 ± 0,011
OREX	1	Pedúnculo cerebelar	34,25	0,0925
OREX	1	Parte peduncular área hipotal. lateral	54,3	0,152
ALM	1	Pedúnculo cerebelar	38	0,1125
ALM	1	Parte peduncular área hipotal. lateral	41,5	0,0775
OREX + ALM	3	Pedúnculo cerebelar (2); parte peduncular área hipotal. lateral	40,9 ± 4,784	0,089 ± 0,014